Progensa PCA3 Assay

In-vitro-Diagnostikum.

Nur für den US-Export.

Allgemeine Informationen

Verwendungszweck

Der Progensa PCA3 Assay ist ein *in vitro* Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT) zum Nachweis von Ribonukleinsäure (RNA) des Prostatakrebs-Gens 3 (Prostate Cancer Gene 3, PCA3) in männlichen Urinproben zur Erzeugung eines PCA3 Score. Der PCA3 Score ist zur Verwendung in Verbindung mit diagnostischen Standard-of-Care-Algorithmen als Hilfsmittel zur Diagnose von Prostatakrebs bestimmt.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die Verwendung des Serumtests auf prostataspezifisches Antigen (PSA) zum Prostatakrebsscreening hat zur Biopsiediagnose von kleineren, zuvor nicht erkannten Tumoren (1) geführt und so ein neues diagnostisches Dilemma geschaffen: Nur ein Bruchteil der Männer mit erhöhten Serum-PSA-Werten haben nachweisbaren Prostatakrebs. Männer mit mindestens einer negativen Biopsie haben oftmals persistent erhöhte Serum-PSA-Werte, die primär durch eine vergrößerte Prostata und benigne Prostatahyperplasie (BPH) bedingt sind. Trotzdem leidet ein signifikanter Anteil der Männer mit leicht erhöhtem Serum-PSA (2,5 – 4,0 µg/L) aktuell oder zu einem späteren Zeitpunkt an klinisch signifikantem Prostatakrebs (1). Obwohl Biopsie noch immer der Goldstandard zum Nachweis von Prostatakrebs ist, sind genauere Tests mit besserer Spezifität erforderlich, die als Entscheidungshilfe zur Prostatabiopsie herangezogen werden können.

PCA3 (auch als „PCA3^{DD3}“ oder „DD3^{PCA3}“ bezeichnet) ist eine nicht kodierende prostataspezifische RNA, die in Prostatakrebszellen stark überexprimiert ist und eine mediane 66-fache Upregulation im Vergleich zu benachbartem benignem Gewebe aufweist (2). Im Gegensatz dazu ist die PSA-Genexpression in kanzerösen und benignen Prostatazellen ähnlich; PSA-RNA-Werte können daher zur Normalisierung für die Menge der prostataspezifischen Ribonukleinsäure (RNA) in molekularen Testproben verwendet werden. Die Durchführbarkeit von quantitativen PCA3-basierten Molekulartests mit Urinsedimenten (2) und Vollurin (3) wurde nachgewiesen.

Der Progensa PCA3 Assay verwendet Vollurin, der im Anschluss an eine digitale rektale Untersuchung (DRE) mit drei Druckanwendungen pro Lappen gesammelt wurde. Bei der digitalen Rektaluntersuchung werden Prostatazellen durch das Prostata-Gangsystem in den Harntrakt freigesetzt, wo sie im Erststrahlurin gesammelt werden können. Der Urin wird durch Zugabe von Urintransportmedium (UTM) verarbeitet, das die Zellen lysiert und das RNA stabilisiert. PCA3- und PSA-RNA werden quantifiziert und der PCA3 Score wird auf der Grundlage des Anteils an PCA3-/PSA-RNA ermittelt. Zusätzlich zur Normalisierung des PCA3-Signals dient die Messung von PSA-RNA auch zur Bestätigung, dass die Ausbeute von prostataspezifischer RNA ausreichend ist, um zu einem gültigen Ergebnis zu führen. Höhere PCA3 Scores korrelieren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer positiven Prostatabiopsie.

Testprinzip

Der Progensa PCA3 Assay besteht aus zwei quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests. Der Progensa PCA3 Assay verbindet die Technologien Target Capture, transkriptionsvermittelte Amplifikation (Transcription Mediated Amplification, TMA) und Hybridisierungsschutzassay (Hybridization Protection Assay, HPA) zur Rationalisierung der Urinprobenverarbeitung, zur Target-RNA-Amplifikation bzw. zum Nachweis von Amplikon.

Bei der Ausführung des Progensa PCA3 Assay im Labor werden die Ziel-RNA-Moleküle von den Urinproben mittels Target Capture isoliert. Oligonukleotide („Fänger-Oligonukleotide"), die zu sequenzspezifischen Regionen der Targets komplementär sind, werden an die Targets in der Urinprobe hybridisiert. Für jedes Target wird ein separates Fänger-Oligonukleotid verwendet. Das hybridisierte Target wird dann auf magnetischen Mikropartikeln erfasst, die von der Urinprobe in einem Magnetfeld getrennt werden. In Waschschritten werden für das Verfahren unwesentliche Komponenten aus dem Reaktionsröhrchen entfernt. Die magnetische Trennung und Waschschritte werden mit einem Target-Capture-System durchgeführt.

Die Target-Amplifikation erfolgt mittels TMA, d.h. ein transkriptionsbasiertes Nukleinsäureamplifikationsverfahren, das zwei Enzyme, reverse MMLV (Moloney-Mausleukämievirus)-Transkriptase und T7-RNA-Polymerase verwendet. Für jedes Target wird eine spezifische Reihe von Primern verwendet. Die reverse Transkriptase wird zur Erzeugung einer DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Kopie (die eine Promotersequenz für T7-RNA-Polymerase enthält) der Target-Sequenz verwendet. T7-RNA-Polymerase produziert mehrere Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie.

Die Detektion erfolgt mit HPA unter Einsatz von einsträngigen, chemilumineszent-markierten Nukleinsäuresonden, die zum Amplikon komplementär sind. Für jedes Target-Amplikon werden separate Sonden verwendet. Die markierten Nukleinsäuresonden hybridisieren spezifisch an das Amplikon. Das Selektionsreagenz differenziert zwischen hybridisierten und nicht hybridisierten Sonden, indem es die Markierung auf den nicht hybridisierten Sonden inaktiviert. Während des Nachweisvorgangs wird das von der hybridisierten Sonde erzeugte Chemilumineszenzsignal mit einem Luminometer gemessen und in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

PCA3- und PSA-RNA werden in getrennten Röhrchen quantifiziert und der PCA3 Score wird bestimmt. Kalibratoren mit bekannten Mengen von PCA3- oder PSA-RNA-Transkript werden in jedem Assaylauf mitgeführt und zur Erzeugung einer Standardkurve verwendet. PCA3- und PSA-Kontrollen werden ebenfalls mitgeführt, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu bestätigen, die von der Standardkurve interpoliert werden.

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

Hinweis: *Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.*

Die Reagenzien und Materialien, die im Lieferumfang des Progensa PCA3/PSA Assay Kit für den Progensa PCA3 Assay enthalten sind, sind nachstehend aufgeführt. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben dem Reagenznamen angegeben.

Progensa PCA3 Assay Kit, 2 x 100 Reaktionen, Best.-Nr. 302355 (8 Packungen)

Progensa PCA3 100-Reaktionen-Kit

Progensa PCA3 gekühlter Behälter – Lagerung bei 2 °C bis 8 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
A	**PCA3-Amplifikationsreagenz** *Nicht infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet in HEPES-gepufferter Lösung mit <10% Füllstoff.*	1 Fläschchen
E	**PCA3/PSA-Enzymreagenz** *Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, getrocknet in HEPES-gepufferter Lösung mit <10% Füllstoff.*	1 Fläschchen
P	**PCA3-Sondenreagenz** *Nicht infektiöse chemilumineszente DNA-Sonden, getrocknet in sukzinatgepufferter Lösung mit <5% Füllstoff und <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 Fläschchen

Progensa PCA3 Behälter mit Raumtemperatur – Lagerung bei 15 °C bis 30 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
AR	**PCA3-Amplifikationsrekonstitutionslösung** *Wässrige Lösung mit Konservierungsmitteln (<1% Parabene).*	1 x 9,3 mL
ER	**PCA3/PSA-Enzymrekonstitutionslösung** *HEPES-gepufferte Lösung mit einer oberflächenaktiven Substanz (10% Triton X-100) und 20% Glycerol.*	1 x 3,3 mL
PR	**PCA3/PSA-Sondenrekonstitutionslösung** *Sukzinatgepufferte Lösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 x 12,4 mL
S	**PCA3/PSA-Selektionsreagenz** *Boratgepufferte Lösung mit oberflächenaktiver Substanz (1% Triton X-100).*	1 x 31 mL
TCR	**PCA3-Target-Capture-Reagenz** *Nicht infektiöse Nukleinsäure in HEPES-gepufferter Lösung mit Festphase.*	1 x 22 mL
	Abdeckfolie	1 Packung
	Rekonstitutionsverbindungsstücke	1 Packung

Progensa PCA3-Kalibrator- und Kontrollenkit – Lagerung bei 2 °C bis 8 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
CAL	**PCA3-Kalibrator 1** *Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 x 2,0 mL
CAL	**PCA3-Kalibratoren 2-5** *Nicht infektiöse PCA3-Nukleinsäure in Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	4 x 1,7 mL
PC	**PCA3-Positivkontrollen** *Nicht infektiöse PCA3-Nukleinsäure in Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	2 x 1,7 mL
	Blatt mit Konzentrationsinformationen für PCA3	1 Blatt

Progensa PSA 100-Reaktionen-Kit

Progensa PSA gekühlter Behälter – Lagerung bei 2 °C bis 8 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
A	**PSA-Amplifikationsreagenz** *Nicht infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet in HEPES-gepufferter Lösung mit <10% Füllstoff.*	1 Fläschchen
E	**PCA3/PSA-Enzymreagenz** *Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, getrocknet in HEPES-gepufferter Lösung mit <10% Füllstoff.*	1 Fläschchen
P	**PSA-Sondenreagenz** *Nicht infektiöse chemilumineszente DNA-Sonden, getrocknet in sukzinatgepufferter Lösung mit <5% Füllstoff und <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 Fläschchen

Progensa PSA Behälter mit Raumtemperatur – Lagerung bei 15 °C bis 30 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
AR	**PSA-Amplifikationsrekonstitutionslösung** *Wässrige Lösung mit Konservierungsmitteln (<1% Parabene).*	1 x 9,3 mL
ER	**PCA3/PSA-Enzymrekonstitutionslösung** *HEPES-gepufferte Lösung mit einer oberflächenaktiven Substanz (10% Triton X-100) und 20% Glycerol.*	1 x 3,3 mL
PR	**PCA3/PSA-Sondenrekonstitutionslösung** *Sukzinatgepufferte Lösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 x 12,4 mL
S	**PCA3/PSA-Selektionsreagenz** *Boratgepufferte Lösung mit oberflächenaktiver Substanz (1% Triton X-100).*	1 x 31 mL
TCR	**PSA-Target-Capture-Reagenz** *Nicht infektiöse Nukleinsäure in HEPES-gepufferter Lösung mit Festphase.*	1 x 22 mL
	Abdeckfolie	1 Packung
	Rekonstitutionsverbindungsstücke	1 Packung

Progensa PSA-Kalibrator- und Kontrollenkit – Lagerung bei 2 °C bis 8 °C vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
CAL	**PSA-Kalibrator 1** *Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	1 x 2,0 mL
CAL	**PSA-Kalibratoren 2-5** *Nicht infektiöse PSA-Nukleinsäure in Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	4 x 1,7 mL
PC	**PSA-Positivkontrollen** *Nicht infektiöse PSA-Nukleinsäure in Phosphatpufferlösung mit <5% Lithiumlaurylsulfat.*	2 x 1,7 mL
	Blatt mit Konzentrationsinformationen für PSA	1 Blatt

Aptima Assayflüssigkeiten — Lagerung bei 15 °C bis 30 °C (2 Packungen) vom Empfang bis zum angegebenen Verfallsdatum

Symbol	Komponente	Menge
W	**Waschlösung** *HEPES-gepufferte Lösung mit <2% Natriumdodecylsulfat.*	1 x 402 mL
DF	**Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit** *Bicarbonatpufferlösung.*	1 x 402 mL
O	**Ölreagenz** *Silikonöl.*	1 x 24,6 mL

Hinweis: *Alle Materialien, die im Progensa PCA3 Assay Kit enthalten sind, sind auch separat erhältlich (nähere Einzelheiten im Abschnitt Materialien).*

Materialien

Hinweis: *Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.*

Hinweis: *Materialien, die von Hologic erhältlich sind, sind mit der Katalognummer aufgeführt.*

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

	Best.- Nr.
Progensa PCA3 Transportkit für Urinproben	302352
Leader HC+ Luminometer	104747
Hologic Target Capture System (TCS)	104555
Aptima Auto Detect Kit	301048
2 eppendorf Repeater Plus Pipetten	105725
Spitzen für Wiederholungspipetten (2,5 mL, 5,0 mL, 25,0 mL)	—
Entweder:	—
2 Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen 102160F	
3 Umlaufwasserbäder (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C) 104586F	
3 Wasserbad-Distanzhalter 104627	
ODER	
2 SB100 Dry Heat Bath/Vortexers 105524F	
Je nach dem erforderlichen Durchsatz können weitere SB100-Instrumente erforderlich sein	
Mikropipette, 1000 µL RAININ PR1000	901715
Spitzen, 1000 µL P1000	105049
Pipettierer, eppendorf 20 bis 200 µL	105726
Spitzen, Pipetten-, 20 bis 200 µL	—
Bleichmittel, 5-%ige bis 7-%ige (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung	—
Plastikbehälter mit großem Deckel	—
Standard-Urinsammelbehälter, ohne Konservierungsmittel	—
Zehn-Röhrchen-Einheiten (TTU)	TU0022
Zehn-Spitzen-Kassetten (TTC)	104578
SysCheck Kalibrationsstandard	301078

Optionale Materialien

	Best.-Nr.
Progensa PCA3 100-Reaktionen-Kit	302354
Progensa PSA 100-Reaktionen-Kit	302357

		Best.-Nr.
Progensa PCA3 Kalibratoren- und Kontrollenkit		302353
Progensa PSA Kalibratoren- und Kontrollenkit		302356
Progensa PCA3/PSA Proficiency Panels		302350
Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit		302351
Aptima Assayflüssigkeitskit		302002C
Einmal-Pipettenspitzen mit Filter (1 mL)		10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4		900932
PCA3-Deckplatteneinheit, DTS 800	*902021*	—
Reagenzien-Vorratsbehälter (40 mL Viertelmodul)	*104765*	
Geteilter Reagenzien-Vorratsbehälter (19 mL x 2 Viertelmodul)	*901172*	
Transportröhrchen		302521
Ersatzkappen, durchlässig		302520
Ersatzkappen, undurchlässig		103036A

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

A. *In-vitro*-Diagnostikum.

B. Nur für den US-Export.

Laborbezogen

C. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.

D. Die normalen Vorsichtsmaßnahmen im Labor ergreifen. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen. Ungepuderte Einweghandschuhe, Augenschutz und Laborkittel beim Umgang mit Urinproben und Kitreagenzien tragen. Nach der Handhabung von Urinproben und Kitreagenzien die Hände gründlich waschen.

E. **Warnung: Reizmittel, Ätzmittel.** Kontakt von Auto Detect 1 und Auto Detect 2 mit der Haut, den Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt dieser Flüssigkeiten mit der Haut oder den Augen den betroffenen Bereich mit Wasser abwaschen. Bei Verschütten sind diese Flüssigkeiten vor dem Aufwischen mit Wasser zu verdünnen.

F. Arbeitsflächen, Pipetten und andere Geräte müssen regelmäßig mit einer 2,5-%igen bis 3,5-%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden (siehe *Verfahrenshinweise*).

G. Ein getrennter Bereich für die Schritte nach der Amplifikation wird dringend empfohlen, um die Amplikonkontamination im Assay auf ein Mindestmaß zu beschränken. Dieser speziell reservierte Bereich sollte vom Präamplifikationsbereich, wo die Reagenzvorbereitung, Target-Capture und Amplifikation stattfinden, entfernt sein.

H. Damit keine Kontamination der Laborbereiche mit Amplikon auftritt, sollte im Laborbereich ein Arbeitsfluss in einer Richtung von der Reagenzvorbereitung bis nach der Amplifikation implementiert werden. Proben, Geräte und Reagenzien sollten nicht in einen Bereich zurückgebracht werden, wo ein vorheriger Schritt ausgeführt wurde. Das Personal sollte nicht in vorherige Arbeitsbereiche gehen, ohne sachmäßige Sicherheitsvorkehrungen gegen Kontamination zu treffen.

Probenbezogen

I. Nach der Zugabe von Urin muss der Füllstand im Urintransportgefäß zunächst zwischen den beiden schwarzen Markierungslinien auf dem Gefäßetikett liegen. Sonst muss die Probe verworfen werden.

J. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerbedingungen aufrecht erhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht beurteilt.

K. Die Verfallsdaten auf den Probenentnahmekits gelten für die Entnahmestelle und nicht für die Testeinrichtung. Zu irgendeinem Zeitpunkt vor dem Verfallsdatum des Probenentnahmekits gesammelte Proben, die gemäß der Packungsbeilage transportiert und gelagert wurden, sind gültig für Tests, auch wenn das Verfallsdatum auf dem Entnahmeröhrchen überschritten wurde.

L. Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assayleistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Patientenproben beeinträchtigt werden. Spezifische Anweisungen finden Sie unter *Probenentnahme, -transport und -lagerung*.

M. Urinproben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assays sind die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen zu befolgen. Der Laborleiter muss die richtigen Handhabungs- und Entsorgungsverfahren festlegen. Nur Personal, das über eine angemessene Qualifikation und Kompetenz in der Verwendung des Progensa PCA3 Assays verfügt und in der Handhabung von infektiösen Materialien geschult wurde, darf dieses Verfahren ausführen.

N. Kreuzkontamination in den Probenbehandlungsschritten vermeiden. Urinproben können hohe Konzentrationen des RNA-Target enthalten. Es ist sicherzustellen, dass die Probenbehälter nicht miteinander in Berührung kommen. Benutzte Materialien dürfen nicht über offene Behälter hinweg entsorgt werden. Wenn Handschuhe mit einer Probe in Kontakt kommen, die Handschuhe wechseln, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Assaybezogen

O. Diesen Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

P. **Für den Progensa PCA3 Assay Kit: PCA3-Assayreagenzien mit verschiedenen Chargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren** (d.h. für jeden Analyten müssen die Assayreagenzien im gekühlten Behälter und im Behälter mit Raumtemperatur aus der gleichen Charge stammen). Die Assayreagenzien können mit verschiedenen Chargen des Kalibrator- und Kontrollenkits verwendet werden. Aptima Assayflüssigkeitskits sind untereinander austauschbar. PCA3- und PSA-Reagenzienkits müssen nicht die gleiche Chargennummer haben.

Q. Alle Assayreagenzien bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assayleistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Assayreagenzien beeinträchtigt werden. Spezifische Anweisungen finden Sie unter *Lagerungs- und Handhabungsbedingungen* und *Verfahrenshinweise*.

R. Zur Assaydeaktivierung (siehe *Testverfahren*) muss die Konzentration des Bleichmittels **nach der** 1:1-Verdünnung mit Deaktivierungspuffer mindestens 2,5% (0,35 M) Natriumhypochlorit betragen. Um die zur Deaktivierung erforderliche Endkonzentration zu erhalten, muss die Natriumhypochloritlösung daher zu Beginn 5% bis 7% (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochlorit enthalten.

S. Es müssen Spitzen mit hydrophoben Stöpseln verwendet werden. Mindestens zwei Wiederholungspipettierer müssen zur ausschließlichen Verwendung mit diesem Test reserviert werden: einer zur Verwendung in den Präamplifikationsschritten und einer zur Verwendung in den Schritten nach der Amplifikation. Ein Mikropipettierer muss für die Verwendung im Probentransfer reserviert werden, es sei denn, es wird ein TECAN Freedom EVO 100/4-Gerät verwendet. Alle Pipetten müssen regelmäßig gereinigt werden, wie in *Verfahrenshinweise* beschrieben.

T. Bei Verwendung von Wiederholungspipettierern zur Zugabe von Reagenzien darf das Reaktionsröhrchen nicht mit der Pipettenspitze berührt werden, um eine Verschleppung von einem Reaktionsröhrchen zum anderen zu vermeiden.

U. Ausreichendes Mischen ist erforderlich, um korrekte Testergebnisse zu erhalten. Umfassende Informationen finden Sie unter *Verfahrenshinweise*.

V. Separate Wasserbäder sind für die ausschließliche Verwendung in den Präamplifikations- und Amplifikationsschritten und die Schritte nach der Amplifikation bereitzustellen.

W. Das Etikett mancher Reagenzien dieses Kits enthält Risiko- und Sicherheitssymbole, die durch die Europäische Direktive 1999/45/EG vorgeschrieben sind. Diese Reagenzien müssen dementsprechend behandelt werden. Materialsicherheitsdatenblätter sind unter www.hologic.com abrufbar und können auf Wunsch auch angefordert werden.

Lagerungs- und Handhabungsbedingungen

A. Die Informationen zur Lagerung der Reagenzien entnehmen Sie bitte Tabelle 1.

Tabelle 1: Lagerung der Reagenzien

Reagenz/Flüssigkeit	Lagerung, ungeöffnet	Geöffnet/rekonstituiert Stabilität (bis Verfallsdatum)
Amplifikationsreagenzien	2 °C bis 8 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 2 °C bis 8 °C*
Sondenreagenzien	2 °C bis 8 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 2 °C bis 8 °C*
Enzymreagenz	2 °C bis 8 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 2 °C bis 8 °C*
Target-Capture-Reagenzien	15 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 15 °C bis 30 °C
Amplifikationsrekonstitutions-lösung	2 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	Nicht zutr. (Einmalgebrauch)
Sondenrekonstitutionslösung	2 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	Nicht zutr. (Einmalgebrauch)
Enzymrekonstitutionslösung	2 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	Nicht zutr. (Einmalgebrauch)
Selektionsreagenz	2 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 15 °C bis 30 °C
Kalibratoren	2 °C bis 8 °C bis Verfallsdatum	Nicht zutr. (ein Lauf)
Kontrollen	2 °C bis 8 °C bis Verfallsdatum	Nicht zutr. (ein Lauf)
Ölreagenz	15 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 15 °C bis 30 °C
Waschlösung	15 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	30 Tage bei 15 °C bis 30 °C
Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit	15 °C bis 30 °C bis Verfallsdatum	28 Tage bei 15 °C bis 30 °C

*Kann bis zu 4-mal für andere Assayläufe verwendet werden, vorausgesetzt, dass die gesamte Lagerungszeit bei Raumtemperatur nicht mehr als 24 Stunden beträgt.

B. **Das Target-Capture-Reagenz nicht bei Temperaturen unter 15 °C lagern.**

C. Das Sondenreagenz und das rekonstituierte Sondenreagenz sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien müssen vor längerer Lichtexposition bei der Lagerung und Vorbereitung zur Verwendung geschützt werden.

D. **Der Reagenzien nicht einfrieren.**

E. Die Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

F. Progensa PCA3- und PSA-Kalibratoren und -Kontrollen sind Fläschchen für einen Lauf und müssen nach der Verwendung entsorgt werden.

G. Veränderungen des physischen Erscheinungsbildes des gelieferten Reagenzes können ein Anzeichen von Instabilität oder Verfall dieser Materialien sein. Wenn Veränderungen des physischen Erscheinungsbildes der Reagenzien nach der Resuspension beobachtet werden (z.B. offensichtliche Veränderungen der Reagenzfarbe oder Trübung, die auf mikrobielle Kontamination hinweist), nehmen Sie vor der Verwendung mit dem technischen Kundendienst von Hologic Kontakt auf.

H. Entsorgen Sie rekonstituierte Reagenzien nach 30 Tagen oder nach dem Verfallsdatum (ausschlaggebend ist das zuerst eintretende Datum).

I. Geöffnete oder rekonstituierte Restreagenzien können in anschließenden Assays verwendet werden, wenn sie nach dem ersten Gebrauch ordnungsgemäß gelagert wurden. Das Restreagenz kann mit frisch zubereitetem oder anderem übrig gebliebenen Reagenz der gleichen Charge gepoolt werden. **Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Chargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren** (siehe *Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen*). Keine Komponenten des gepoolten Reagenzes dürfen die maximalen Lagerzeiten für geöffnete oder rekonstituierte Reagenzien überschreiten. Stellen Sie sicher, dass das gepoolte Reagenz gut gemischt wurde und ein ausreichendes Volumen hergestellt wurde, um eine ausreichende Reagenzmenge für einen gesamten Assaylauf bereitzustellen.

Probenentnahme, -transport und -lagerung

Der Progensa PCA3 Assay wurde zur Quantifizierung von PCA3- und PSA-RNA entwickelt, die im Erststrahlurin nach einer digitalen Rektaluntersuchung mit drei Druckanwendungen pro Lappen gesammelt wurden. Der Urin wird mit dem Progensa PCA3 Transportkit für Urinproben verarbeitet. Die Stabilität von PCA3- und PSA-RNA in Urin und behandeltem Urin wurde durch Überwachung der RNA-Kopie-Spiegel in Urinproben, die gemäß der nachstehenden Anleitung gesammelt wurden, bestimmt.

A. Anleitung zur Sammlung und Verarbeitung von Urinproben:

1. Es kann sich als nützlich erweisen, wenn der Patient eine große Menge Wasser (ca. 500 mL) trinkt, um ausreichend Urin für die Probenahme sicherzustellen.
2. Führen Sie unmittelbar vor der Urinsammlung eine digitale Rektaluntersuchung, wie nachstehend beschrieben, durch:

   Drücken Sie fest genug auf die Prostata, um die Oberfläche ungefähr 1 cm weit einzudrücken, und zwar für beide Lappen jeweils von der Basis bis zum Apex und von der lateralen zur medialen Linie, wie in Abbildung 1 gezeigt. Führen Sie genau drei Druckanwendungen für jeden Lappen aus. Dies soll keine Prostatamassage sein.

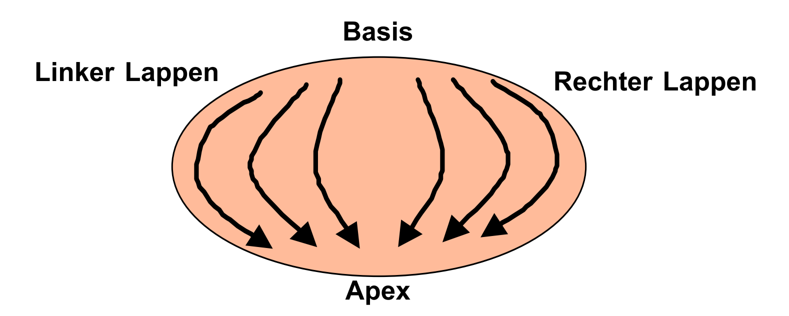


Abbildung 1. Richtige Richtung der Druckanwendung auf die Prostata

3. Weisen Sie den Patienten an, nach der digitalen Rektaluntersuchung in einem entsprechend etikettierten Urinsammelbecher Urin aus dem Erststrahlurin (ca. 20 bis 30 mL des ersten Harnstrahls) aufzufangen. Dies muss eine Probe aus dem ersten Harnabgang nach der digitalen Rektaluntersuchung sein. Verwenden Sie einen Sammelbecher ohne Konservierungsstoffe. Wenn ein Patient den Harnfluss nicht mittendrin stoppen kann und mehr als die angeforderten 20 bis 30 mL Urin bereitstellt, behalten Sie die gesamte Menge. Mindestens 2,5 mL Urin sind zur Durchführung des Progensa PCA3 Assays erforderlich. Mindestens diese Menge muss von einem Patienten, der nicht das gesamte angeforderte Urinvolumen liefern kann, bereitgestellt werden. Sonst muss die Probe verworfen werden.

   Hinweis: *Bei einem sehr hohen Urinvolumen kann die Konzentration der Analyten PCA3 und PSA absinken, was gelegentlich zu einer ungültigen Probe führen kann. Der Patient sollte daher nicht versuchen, den Urinsammelbecher ganz zu füllen.*

4. **Wenn Urinproben nicht sofort behandelt werden, müssen die unbehandelten Urinproben bei 2 °C bis 8 °C oder auf Eis gelagert werden. Die gekühlte, unbehandelte Urinprobe muss innerhalb von vier Stunden nach der Sammlung in das Urinproben-Transportröhrchen transferiert werden. Andernfalls muss die Probe zurückgewiesen und eine neue Probe entnommen werden. Unbehandelte Urinproben nicht einfrieren.**

5. Zur Verarbeitung von Urinproben diese fest verschließen und 5 x umdrehen, um die Zellen zu resuspendieren. Entfernen Sie den Deckel des Urinproben-Transportröhrchens und transferieren Sie mit der bereitgestellten Einweg-Transferpipette 2,5 mL des gesammelten Urins in das Röhrchen. Das richtige Urinvolumen wurde hinzugefügt, wenn das Flüssigkeitsniveau zwischen den schwarzen Fülllinien auf dem Etikett des Urinproben-Transportröhrchens liegt.
6. Verschließen Sie das Urintransportröhrchen wieder fest und drehen Sie die Urinprobe zum Vermischen 5 Mal um. Das wird jetzt als behandelte Urinprobe bezeichnet.

B. Probentransport und -lagerung vor dem Test:

1. Behandelte Urinproben müssen im Urinproben-Transportröhrchen ins Labor gebracht werden. Der Transport kann unter Umgebungsbedingungen (ohne Temperaturüberwachung) oder gefroren erfolgen. Es müssen Versandvorkehrungen getroffen werden um sicherzustellen, dass die Proben innerhalb von 5 Tagen nach der Sammlung am Testzentrum eingehen.

   Nach Eingang der Lieferung sollte das Labor das Datum der Probenentnahme auf dem Röhrchen überprüfen. Proben, die unter Umgebungsbedingungen transportiert wurden und mehr als 5 Tage nach der Probenentnahme eingehen, müssen verworfen werden. In diesem Fall eine neue Probe anfordern. Das Labor kann die Proben bis zu 14 Tage bei 2 °C bis 8 °C lagern, bevor sie entsorgt werden müssen. Wenn längere Zeiten erforderlich sind, die zulässigen Lagerfristen bei verschiedenen Temperaturen in Tabelle 2 beachten.

   Tabelle 2: Lagerzeiträume für behandelte Urinproben

Lagertemperatur	Zeit
Lagerung und Versand von verarbeiteten Proben:	Bis zu 5 Tage*
Nach Eingang am Testzentrum:	
2 °C bis 8 °C	Bis zu 14 Tage
-35 °C bis -15 °C	Bis zu 11 Monate**
Bei oder unter -65 °C	Bis zu 36 Monate**

   *Für Transport unter Umgebungsbedingungen oder gefroren zulässige Zeit.

   **Nach der gekühlten Lagerung zulässige Zeit.

2. Die behandelten Urinproben können bis zu 5 Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen werden.

C. Probenlagerung nach dem Test:

1. Die bereits getesteten Proben müssen aufrecht in einem Ständer gelagert werden.
2. Die Urinproben-Transportröhrchen sind, wenn sie nicht mit einem unversehrten Deckel wieder verschlossen werden, mit einem neuen Barriereschutz aus sauberem Plastik oder Folie zu bedecken.
3. Wenn getestete Proben gefroren oder versandt werden müssen, entfernen Sie die durchlässigen Kappen und setzen Sie neue undurchlässige Kappen auf die Urinproben-Transportgefäße. Falls die Proben für den Test an eine andere Einrichtung transportiert werden müssen, sind dabei die empfohlenen Temperaturen einzuhalten. **Vermeiden Sie Verspritzen und Kreuzkontamination.**

Hinweis: *Der Versand der Proben muss in Übereinstimmung mit geltenden nationalen und internationalen Frachtbestimmungen erfolgen.*

Testverfahren

A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

1. Temperieren Sie ein Wasserbad auf 62 °C ± 1 °C zur Präamplifikation, ein zweites Wasserbad auf 42 °C ± 1 °C zur Amplifikation und ein drittes Wasserbad auf 62 °C ± 1 °C für die Schritte nach der Amplifikation. Stellen Sie sicher, dass die Wasserbäder ausreichend Wasser enthalten (siehe *Verfahrenshinweise*). Bei Verwendung des SB100 Dry Heat Bath/Vortexers siehe die *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer-Anwendungshinweise für den* Progensa *PCA3 Assay* (*SB100-Anwendungshinweise*).
2. Arbeitsflächen und Pipetten müssen vor Assaybeginn mit einer 2,5-%igen bis 3,5-%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden. Lassen Sie die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf Flächen und Pipetten einwirken. Spülen Sie sie anschließend mit Wasser ab. Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen. Decken Sie die Arbeitsfläche, auf der der Test durchgeführt wird, mit sauberen, absorbierenden Labortischunterlagen mit Kunststoffunterschicht ab.
3. Setzen Sie eine ausreichende Anzahl Zehn-Spitzen-Kassetten in das Target-Capture-System (TCS). Stellen Sie sicher, dass die TCS-Waschflasche mit der Waschlösung gefüllt ist und die Absaugvorrichtung an der Vakuumpumpe angeschlossen ist. (Siehe die Bedienungsanleitung des Target-Capture-Systems (*Target Capture System Operator's Manual*).)

B. Reagenzrekonstitution und -vorbereitung

Die Reagenzrekonstitution sollte vor Beginn des Probentransfers durchgeführt werden.

1. Kombinieren Sie zur Rekonstitution von Amplifikations-, Enzym- und Sondenreagenz jeweils die Flasche mit gefriergetrocknetem Reagenz mit der Rekonstitutionslösung. Lassen Sie ggf. gekühlte Rekonstitutionslösungen vor Gebrauch auf Raumtemperatur kommen.

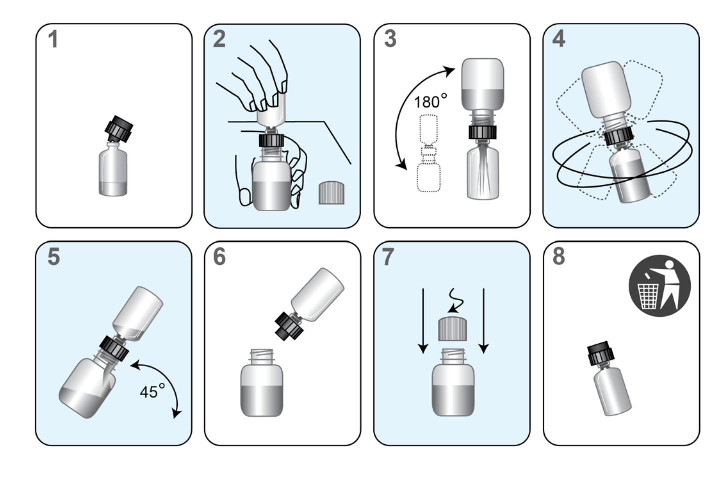


Abbildung 2. Rekonstitutionsverfahren

   a. Paaren Sie die entsprechende Rekonstitutionslösung mit dem getrockneten Reagenz. Bestätigen Sie, dass die Fläschchen übereinstimmende Etikettenfarben aufweisen, um sicherzustellen, dass sie richtig gepaart wurden.
   b. Öffnen Sie das Fläschchen mit dem getrockneten Reagenz und stecken Sie das gekerbte Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks fest in die Fläschchenöffnung (Abbildung 2, Schritt 1).

c. Öffnen Sie die entsprechende Rekonstitutionslösung und legen Sie den Deckel auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche. Halten Sie die Flasche mit der Lösung auf dem Labortisch fest und stecken Sie das andere Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks fest in die Flaschenöffnung (Abbildung 2, Schritt 2).

d. Drehen Sie die zusammengebauten Flaschen langsam um. Lassen Sie die Lösung aus der Flasche in das Glasfläschchen ablaufen (Abbildung 2, Schritt 3). Warten Sie, bis das lyophilisierte Reagenz in Lösung gegangen ist und schwenken Sie dann die Lösung behutsam im Glasfläschchen, um sie zu vermischen. Beim Schwenken der Flasche Schaumbildung vermeiden (Abbildung 2, Schritt 4).

e. Drehen Sie die zusammengebaute Einheit um und neigen Sie sie im Winkel von 45°, um die Schaumbildung auf ein Mindestmaß zu beschränken (Abbildung 2, Schritt 5). Lassen Sie die gesamte Flüssigkeit in die Plastikflasche zurücklaufen.

f. Entfernen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 2, Schritt 6).

g. Verschließen Sie das Plastikfläschchen wieder (Abbildung 2, Schritt 7). Tragen Sie auf allen Fläschchen mit rekonstituierten Reagenzien die Initialen des Bedieners und das Rekonstitutionsdatum ein. Achten Sie darauf, dass Sie den Analyten (PCA3 oder PSA) auf den Sondenreagenzfläschchen vermerken.

h. Entsorgen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 2, Schritt 8).

2. Zuvor rekonstituiertes Sonden-, Amplifikations- und Enzymreagenz muss vor dem Start des Assays auf Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C) gebracht werden. Siehe *Lagerungs- und Handhabungsbedingungen* zum Poolen von Restreagenzien. Wenn das rekonstituierte Amplifikationsreagenz ein Präzipitat enthält, das bei Raumtemperatur nicht wieder in Lösung geht, erwärmen Sie es im Präamplifikationsbereich 1 bis 2 Minuten auf 62 °C ± 1 °C. Wenn das rekonstituierte Sondenreagenz ein Präzipitat enthält, das bei Raumtemperatur nicht wieder in Lösung geht, erwärmen Sie es im Bereich für die Schritte nach der Amplifikation 1 bis 2 Minuten auf 62 °C ± 1 °C. Nach diesen Erwärmungsschritten kann das rekonstituierte Reagenz verwendet werden, selbst wenn noch ein Restpräzipitat vorhanden ist. Nach der Resuspension die Fläschchen durch vorsichtiges Umdrehen vermischen.

C. Ständeraufbau

Der für Target Capture, Probentransfer und Amplifikation verwendete Wiederholungspipettierer muss ausschließlich zur Verwendung in diesen Schritten reserviert sein (siehe *Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen*).

1. Bauen Sie einen Ständer für den PCA3-Analyten und einen anderen Ständer für den PSA-Analyten auf.

   Hinweis: *Bei einer geringen Anzahl an Proben können beide Analyte in einem Ständer getestet werden. Bei Verwendung des TECAN Freedom EVO 100/4-Geräts müssen für jeden Analyten separate Ständer verwendet werden. Es dürfen jeweils nicht mehr als zwei volle Ständer (20 TTUs) getestet werden.*

2. Setzen Sie ausreichend Zehn-Röhrchen-Einheiten (TTUs) in den TTU-Ständer für die Kalibratoren, Kontrollen und Proben für jeden Analyten.

3. Beschriften Sie die TTUs mit den Proben-IDs. Tabelle 3 beschreibt die Zugabe der Kalibratoren, Kontrollen und Proben. Starten Sie die PSA-Kalibratoren in einer neuen TTU.

   Hinweis: *Die Kalibratoren sollen jeweils in drei Replikationen und die Kontrollen in zwei Replikationen ausgeführt werden. Sie müssen auf dem gleichen Ständer wie die Proben getestet werden. Proben müssen im Doppel getestet werden. Zwischen den Kalibratoren, Kontrollen und Proben keine leeren Reaktionsröhrchen lassen. Bei Verwendung des TECAN Freedom EVO 100/4-Geräts beziehen Sie sich bitte auf die TECAN Freedom EVO 100/40-Anwendungshinweise für den Progensa PCA3 Assay (TECAN Freedom EVO-Anwendungshinweise) für weitere Anweisungen.*

Tabelle 3: Beispiel für einen Ständeraufbau

Ständer Position	Probe Beschreibung	*Target-PCA3-Konzentration (Kopien/mL)	*Target-PSA-Konzentration (Kopien/mL)
1 bis 3	Kalibrator 1	0	0
4 bis 6	Kalibrator 2	250	7500
7 bis 9	Kalibrator 3	2500	75.000
10 bis 12	Kalibrator 4	25.000	750.000
13 bis 15	Kalibrator 5	125.000	3.000.000
16 bis 17	Kontrolle A	1250	37.500
18 bis 19	Kontrolle B	62.500	1.500.000
20 bis n	Patientenprobe	unbekannt	unbekannt

*PCA3- und PSA-Positivkalibratoren und -kontrollen haben zugewiesene Werte, sodass die tatsächlichen Kopien/mL-Werte für die Kalibratoren 2 bis 5 und die Kontrollen A und B leicht von den in der Tabelle aufgeführten Target-Konzentrationen abweichen. Sie sind auch von Charge zu Charge verschieden. Die Konzentrationsinformationen werden auf einer Karte in der Verpackung der Kalibrator- und Kontrollfläschchen bereitgestellt und werden zur Kalibration und Bestimmung der Validität des Laufs verwendet.

D. Prüfung der Konzentrationsinformationen

Überprüfen Sie mit dem Systemadministrator der Progensa PCA3 Assay Software, dass die Konzentrationsinformationen für die getesteten Chargen der Progensa PCA3- und PSA-Kalibratoren- und Kontrollenkits eingegeben wurden. Nähere Informationen finden Sie in der *Kurzanleitung für den Progensa PCA3 Assay* (*Kurzanleitung*) oder dem *Handbuch des Systemadministrators für die Progensa PCA3 Assay Software*.

Hinweis: *Die Eingabe der Konzentrationsinformationen ist* ***vor der ersten Verwendung*** *jeder neuen Kalibrator- und Kontrollenkit-Charge erforderlich. Anschließende Läufe mit Kalibratoren und Kontrollen aus der gleichen Kitcharge erfordern keine weitere Maßnahme.*

E. Einrichtung des Worklist Editor

Generieren Sie mit dem Hologic Worklist Editor eine Assaylauf-Arbeitsliste auf einem Computer, der sich im Präamplifikationsbereich befindet. Informationen zur Verwendung des Worklist Editor finden Sie in der *Kurzanleitung* oder *Bedienungsanleitung für den Hologic Worklist Editor*. Bei Verwendung des TECAN Freedom EVO 100/4-Geräts finden Sie nähere Anweisungen auch in den *TECAN Freedom EVO-Anwendungshinweisen*.

F. Probenvorbereitung

1. Lassen Sie die Kalibratoren und Kontrollen vor dem Test auf Raumtemperatur kommen. Vermischen Sie die Fläschchen durch vorsichtiges Umdrehen.

2. Lassen Sie die Proben vor dem Test auf Raumtemperatur kommen. **Proben nicht mit dem Vortex-Mischer mischen.** Die Proben sollten durch gelegentliches, vorsichtiges Umdrehen während der Erwärmungszeit vermischt werden. Informationen über Präzipitate, die nicht in Lösung gehen, und den Umgang mit gefrorenen Proben entnehmen Sie bitte dem Abschnitt *Verfahrenshinweise*.

G. Präamplifikation

Die Präamplifikationsumgebung muss 15 °C bis 30 °C betragen. Führen Sie die Läufe für beide Ständer parallel aus. Bei Verwendung des SB100 Dry Heat Bath/Vortexers siehe die *SB100-Anwendungshinweise.* Bei Verwendung des TECAN Freedom EVO 100/4-Geräts finden Sie nähere Anweisungen auch in den *TECAN Freedom EVO-Anwendungshinweisen*.

1. Durch Schwenken oder Umdrehen des Target-Capture-Reagenzes (TCR) gründlich vermischen. Geben Sie mit dem Wiederholungspipettierer 100 µL des analytspezifischen TCR in das entsprechende Reaktionsröhrchen.
2. Durchstechen Sie den Deckel des Kalibratorfläschchens mit dem Mikropipettierer und geben Sie 400 µL des Kalibrators in das vorschriftsmäßig beschriftete Reaktionsröhrchen hinzu. Ziehen Sie mit der gleichen Pipettenspitze Replikatzugaben aus dem Fläschchen durch den durchstochenen Deckel ab. Verwenden Sie neue Pipettenspitzen für jedes Kalibratorfläschchen. Wiederholen Sie diesen Vorgang für die Zugabe der Kontrollen und Proben. Eventuelle Probenreste abdecken und aufheben und bei 8 °C oder darunter lagern, falls Wiederholungstests erforderlich sein sollten (nähere Informationen siehe *Probenentnahme, -transport und -lagerung*).
3. Bedecken Sie die TTUs mit Abdeckfolien und schütteln Sie den Ständer vorsichtig von Hand. **Nicht mit dem Vortex-Mischer mischen.** Den Ständer bei 62 °C ± 1 °C in einem Wasserbad für die Dauer von 30 ± 5 Minuten inkubieren.
4. Entfernen Sie den Ständer aus dem Wasserbad und tupfen Sie den Boden der Röhrchen auf saugfähigem Material ab.
5. Stellen Sie sicher, dass die Abdeckfolien fest angelegt sind. Ersetzen Sie sie ggf. durch neue Abdeckfolien und versiegeln Sie die TTUs fest.
6. Mischen Sie den Ständer 60 Sekunden mit dem Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen (siehe *Verfahrenshinweise*). Beginnen Sie mit dem Mischen mit dem Vortex-Mischer innerhalb von 2 Minuten nach der Entnahme des Ständers aus dem Wasserbad.
7. Inkubieren Sie den Ständer mit angelegten Abdeckfolien bei Raumtemperatur für 30 ± 5 Minuten.
8. Setzen Sie den Ständer 5 bis 10 Minuten mit dem Schild mit der Aufschrift VORDERSEITE auf den magnetischen Sockel des TCS. Beladen Sie den TTC-Ständer mit TTCs.
9. Entlüften Sie die Pumpleitungen der Dispensierstation, indem Sie Waschlösung durch die Dosiervorrichtung pumpen. Pumpen Sie ausreichend Flüssigkeit durch das System, sodass keine Luftblasen in der Leitung vorliegen und alle zehn Düsen einen stetigen Flüssigkeitsstrom abgeben.
10. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein und trennen Sie die Absaugvorrichtung am ersten Anschluss zwischen der Absaugvorrichtung und der Auffangflasche. Vergewissern Sie sich, dass das Vakuummessgerät die Spezifikation des Lecktests erfüllt. Eventuell dauert es 15 Sekunden, bis dieser Messwert zur Verfügung steht. Schließen Sie die Vorrichtung wieder an und stellen Sie sicher, dass das

Vakuummessgerät die Spezifikation des Vakuumniveaus erfüllt. Lassen Sie die Vakuumpumpe eingeschaltet, bis alle Target-Capture-Schritte abgeschlossen sind und die Schläuche der Absaugvorrichtung trocken sind.

Beziehen Sie sich auf das Vakuumspezifikationsblatt für das Target-Capture-System hinten in der *Bedienungsanleitung des Target-Capture-Systems* oder nehmen Sie mit dem Technischen Kundendienst von Hologic Kontakt auf.

11. Setzen Sie die Absaugvorrichtung fest auf dem ersten Satz Spitzen auf. Lassen Sie die Spitzen in die erste TTU herab, bis die Spitzen den Flüssigkeitsspiegel berühren. Halten Sie bei der Abwärtsbewegung die Spitzen weiterhin in Kontakt mit dem Flüssigkeitsspiegel, bis die Spitzen kurz den Boden der Röhrchen berühren. Klopfen Sie mit den Spitzen leicht auf den Röhrchenboden, bis die verbleibende Flüssigkeit restlos entfernt wurde. Die Spitzen nicht länger mit dem Röhrchenboden in Kontakt lassen oder schnell anklopfen, da ansonsten zu viel Schaum in der Vakuumfalle entstehen kann.
12. Nach Abschluss der Aspiration werfen Sie die Spitzen in die Original-Spitzenkassette aus. Wiederholen Sie die Aspirationsschritte für die restlichen TTUs, wobei Sie eine gesonderte Spitze für jedes Reaktionsröhrchen verwenden.
13. Setzen Sie jeweils die Dosiervorrichtung über die TTU und geben Sie, unter Verwendung der Dispensierstationspumpe, 1,0 mL Waschlösung in jedes TTU-Röhrchen.
14. Bedecken Sie die Röhrchen mit Abdeckfolie und nehmen Sie den Ständer aus dem TCS. Mischen Sie den Ständer einmal mit dem Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen. Nähere Informationen finden Sie unter *Verfahrenshinweise*.
15. Setzen Sie den Ständer 5 bis 10 Minuten auf den magnetischen Sockel des TCS.
16. Aspirieren Sie die gesamte Flüssigkeit wie in Schritte 11 und 12 beschrieben.
17. Entfernen Sie den Ständer nach der letzten Aspiration aus dem Sockel des TCS und unterziehen Sie die Röhrchen einer Sichtprüfung, um sicherzustellen, dass die gesamte Flüssigkeit aspiriert wurde und dass alle Röhrchen Magnetpartikel-Pellets enthalten. Wenn Flüssigkeit sichtbar ist, setzen Sie den Ständer noch einmal 2 Minuten auf den Sockel des TCS und wiederholen die Aspiration für diese TTU mit den gleichen Spitzen, die zuvor für jedes Reaktionsröhrchen verwendet wurden. Wenn nach Abschluss der Aspiration IRGENDEIN Magnetpartikel-Pellet sichtbar ist, kann das Röhrchen angenommen werden. Wenn kein Pellet sichtbar ist, sollte die Probe erneut getestet werden. Wenn die gleiche Probe in diesem Schritt in einem anschließenden Lauf kein Magnetpartikel-Pellet enthält, kann dies ein Hinweis auf ein probenspezifisches Problem sein. In dieser Situation wird die erneute Entnahme der Urinprobe empfohlen.

H. Amplifikation

Hinweis: *Die Enzymzugabe zu einem Reaktionsständer (Schritte 6 und 7 unten) muss in 90 Sekunden oder weniger ausgeführt werden.*

Führen Sie Schritte 6 und 7 auf einem Ständer durch, bevor Sie sie auf dem zweiten Ständer wiederholen. Bei Verwendung des SB100 Dry Heat Bath/Vortexers siehe die SB100-Anwendungshinweise. Bei Verwendung des TECAN Freedom EVO 100/4-Geräts finden Sie nähere Anweisungen auch in den *TECAN Freedom EVO-Anwendungshinweisen*.

1. Geben Sie mit dem Wiederholungspipettierer 75 µL rekonstituiertes analytspezifisches Amplifikationsreagenz in jedes Reaktionsröhrchen. Alle Reaktionsmischungen im Ständer sollten eine rote Färbung aufweisen.
2. Geben Sie mit der Wiederholungspipette 200 µL Ölreagenz hinzu.
3. Decken Sie die Röhrchen mit Abdeckfolie ab und mischen Sie sie mit dem Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen.
4. Den Ständer bei 62 °C ± 1 °C im Präamplifikationswasserbad für die Dauer von 10 ± 5 Minuten inkubieren.
5. Den Ständer in ein Wasserbad mit 42 °C ± 1 °C für die Dauer von 5 ± 2 Minuten transferieren.
6. Entfernen Sie, während der Ständer im Wasserbad ist, vorsichtig die Abdeckfolie und geben Sie mit dem Wiederholungspipettierer 25 µL des rekonstituierten Enzymreagenzes zu jeder der Reaktionsmischungen hinzu. Alle Reaktionsmischungen sollten nun orangefarben sein.
7. Bedecken Sie die Röhrchen sofort mit einer frischen Abdeckfolie, nehmen Sie den Ständer aus dem Wasserbad und mischen Sie die Reaktionslösungen schnell, indem Sie den Ständer vorsichtig von Hand schütteln.

   Hinweis: *Der Ständer sollte nur eine möglichst kurze Zeitspanne aus dem Wasserbad entfernt werden, damit die Röhrchen sich nicht abkühlen.*
8. Inkubieren Sie den Ständer 60 ± 5 Minuten bei 42 °C ± 1 °C.

I. Post-Amplifikation

Der bei der Hybridisierung und Selektion verwendete Wiederholungspipettierer sollte nur für diese Schritte verwendet werden (siehe *Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen*). Die Umgebung für die Schritte nach der Amplifikation, einschließlich Detektion, muss eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C haben. Bei Verwendung des SB100 Dry Heat Bath/Vortexers siehe die *SB100-Anwendungshinweise.*

1. Hybridisierung
   a. Entfernen Sie den Ständer aus dem Präamplifikationswasserbad und überführen Sie ihn in den Bereich für die Schritte nach der Amplifikation. Geben Sie mit dem Wiederholungspipettierer 100 µL des rekonstituierten analytspezifischen Sondenreagenzes hinzu. Alle Reaktionsmischungen sollten jetzt eine gelbe Farbe aufweisen.
   b. Bedecken Sie die Röhrchen mit Abdeckfolie und mischen Sie sie 10 Sekunden, oder bis sich eine gleichmäßige Farbe einstellt, in einem Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen.
   c. Den Ständer bei 62 °C ± 1 °C in einem Wasserbad für die Dauer von 20 ± 5 Minuten inkubieren.
   d. Entfernen Sie den Ständer aus dem Wasserbad und inkubieren Sie ihn 5 ± 1 Minute bei Raumtemperatur.
2. Auswahl
   a. Geben Sie mit dem Wiederholungspipettierer 250 µL rekonstituiertes Selektionsreagenz in jedes Reaktionsröhrchen. Alle Reaktionsmischungen sollten nun rosa sein.
   b. Decken Sie die Röhrchen mit Abdeckfolie ab, mischen Sie den Ständer 10 Sekunden in einem Vortex-Mischer, oder bis sich eine gleichmäßige Färbung

einstellt, und inkubieren Sie den Ständer 10 ± 1 Minuten bei 62 °C ± 1 °C in einem Wasserbad.

c. Nehmen Sie den Ständer aus dem Wasserbad. Inkubieren Sie den Ständer bei Raumtemperatur für 15 ± 3 Minuten.

J. Detektion

Bei Einsatz des Leader HC+ Luminometers beziehen Sie sich bitte auf die *Bedienungsanleitung für das Leader HC+ Luminometer*. Für die Verwendung der Progensa PCA3 Assay Software beziehen Sie sich auf die *Kurzanleitung* und das *Handbuch des Systemadministrators und die Bedienungsanleitung für die Progensa PCA3 Assay Software*.

1. Bereiten Sie das Leader HC+ Luminometer vor, indem Sie eine leere TTU in Kassettenposition 1 setzen und das WASCH-Protokoll ein Mal durchführen.
2. Stellen Sie sicher, dass ausreichende Volumina an Auto Detect 1 und Auto Detect 2 zur Durchführung der Reaktionen vorhanden sind.
3. Laden Sie die TTUs in das Luminometer, indem Sie sich nach dem Diagramm im Luminometer richten. Wenn beide Analyten (aufeinanderfolgende Läufe) getestet werden, laden Sie alle PCA3 TTUs zuerst, unmittelbar gefolgt von allen PSA TTUs.
4. Melden Sie sich am Computer an. Klicken Sie auf **NEW RUN** (Neuer Lauf) und wählen Sie das entsprechende Assayprotokoll und die Konzentrationen. Klicken Sie auf **NEXT** (Weiter), um den Durchlauf zu beginnen.

   Hinweis: *Der Lauf muss innerhalb von 2 Stunden vom Ende der Inkubation bei 62 °C im Selektionsschritt abgeschlossen werden.*
5. Bereiten Sie Deaktivierungsflüssigkeit vor, indem Sie 5-%ige bis 7-%ige (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung und Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit zu gleichen Volumenteilen in einem Plastikbehälter mit großem Verschluss vermischen. Beschriften Sie den Plastikbehälter (einschl. Verfallsdatum). Deaktivierungsflüssigkeit ist bei Raumtemperatur 4 Wochen lang stabil.
6. Nach Abschluss des Laufs erzeugt die Assay-Software zwei Laufberichte – einen Laufbericht mit Rohdaten und einen Bericht mit Verhältnisdaten –, wenn die Läufe aufeinanderfolgende Läufe sind (siehe *Qualitätskontrollverfahren* und *Interpretation der Ergebnisse*).
7. Entfernen Sie nach Abschluss des Laufs die gebrauchten TTUs aus dem Luminometer und setzen Sie diese TTUs in den Behälter mit Deaktivierungsflüssigkeit. Belassen Sie die TTUs vor der Entsorgung mindestens 15 Minuten im Behälter. Der Laborleiter muss die richtigen Handhabungs- und Entsorgungsverfahren festlegen.

Verfahrenshinweise

A. Probenvorbereitung

1. Wenn die Proben suspendierte Präzipitate enthalten, diese bis zu 5 Minuten lang auf 37 °C erwärmen und danach vorsichtig umdrehen. Wenn das Präzipitat nicht wieder in Lösung geht, stellen Sie sicher, dass das Präzipitat nicht die Abgabe der Probe verhindert.
2. Gefrorene Proben müssen bei Raumtemperatur aufgetaut werden (15 °C bis 30 °C, Verwendung von Wasserbad zulässig). Während des Auftauens gelegentlich umdrehen, um die Bildung eines unlöslichen Stöpsels zu verhindern. Vermischen Sie

die Fläschchen durch vorsichtiges Umdrehen, wenn das Eis im Fläschchen ausreichend aufgetaut ist, so dass es sich gelöst hat und sich frei bewegen kann. Setzen Sie die Erwärmung fort, bis die Probe vollständig aufgetaut ist, und mischen Sie die Fläschchen erneut durch vorsichtiges Umdrehen.

a. Wenn sich ein Stöpsel bildet und Proben mit dem TECAN Freedom EVO 100/4-Gerät pipettiert werden, gefrieren Sie die Probe erneut, wiederholen Sie das Auftauverfahren und stellen Sie sicher, dass sich keine Stöpsel bilden. Wenn sich der Stöpsel nicht eliminieren lässt, muss die Probe manuell pipettiert werden.
b. Wenn sich ein Stöpsel bildet und die Proben mit einem Mikropipettierer manuell pipettiert werden, sind keine weiteren Maßnahmen erforderlich. Stellen Sie lediglich sicher, dass der Stöpsel die Abgabe der Probe nicht verhindert.

B. Pipettieren von Kontrollen, Kalibratoren und Proben

1. Der Kalibrator, die Kontrolle oder die Probe, die zur TTU hinzugegeben wird, sollte ein Volumen von 400 µL haben. Um sicherzustellen, dass das richtige Volumen transferiert wurde, wird eine Sichtkontrolle des in die TTU pipettierten Volumens empfohlen. Um genaue Ergebnisse zu erhalten, muss das richtige Volumen verwendet werden.
2. Stellen Sie sicher, dass die Pipettenspitze richtig auf dem Pipettierer sitzt. Überprüfen Sie auch, dass die Volumeneinstellung richtig ist. Es wird empfohlen, die Volumeneinstellung am Ende jeder TTU (alle 10 Röhrchen) einer Sichtprüfung zu unterziehen. Lassen Sie den Pipettenkolben beim Abziehen einer Probe langsam und stetig los, um Schaum- und Luftblasenbildung zu vermeiden.

C. Reagenzien

1. In der Sondenrekonstitutionslösung kann sich während der Lagerung ein Niederschlag bilden. Erwärmen Sie die Lösung 1 bis 2 Minuten auf 62 °C ± 1 °C. Nach diesem Erwärmungsschritt kann die Sondenrekonstitutionslösung auch dann verwendet werden, wenn noch Niederschlagsreste vorhanden sind. Nach der Resuspension das Fläschchen durch vorsichtiges Umdrehen vermischen.
2. Beim Pipettieren von anderen Reagenzien als Enzym zielen Sie leicht seitlich auf den Boden des Reaktionsröhrchens ab (wo der Boden abgerundet ist und in die Seiten übergeht). Beim Pipettieren von Enzymreagenz zielen Sie direkt auf die Mitte des Reaktionsröhrchens. Bestätigen Sie visuell, dass die Reagenzien richtig dispensiert werden (nicht zuviel Reagenz an den Seiten der Röhrchen und richtige Farbänderung).

D. Temperatur

1. Die Reaktionen für Target Capture, Amplifikation, Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängig. Daher ist es unbedingt erforderlich, dass die Wasserbäder innerhalb der angegebenen Temperaturbereiche gehalten werden.
2. Raumtemperatur ist definiert als 15 °C bis 30 °C.

E. Zeit

Die Reaktionen für Target Capture, Amplifikation, Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängig. Halten Sie die unter *Testverfahren* angegebenen Zeiten ein.

F. Mischen mit dem Vortex-Mischer

Richtiges Mischen mit dem Vortex-Mischer ist für die erfolgreiche Performance des Progensa PCA3 Assays wichtig. Zum Mischen von Reaktionsmischungen mit dem Vortex-Mischer stellen Sie den Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen auf die niedrigste Einstellung ein, sichern den Ständer und schalten den Mischer ein. Steigern Sie langsam das Tempo, bis die Flüssigkeit auf die halbe Höhe des Röhrchens angestiegen ist. Mischen Sie mit dem Vortex-Mischer 10 Sekunden, über den angegebenen Zeitraum oder bis sich eine gleichmäßige Farbe einstellt. Stellen Sie dann die Geschwindigkeit auf die niedrigste Einstellung, bevor Sie den Vortex-Mischer für mehrere Röhrchen ausschalten und den Ständer entnehmen. Die Reaktionsmischungen dürfen nicht die Abdeckfolie berühren.

G. Wasserbäder

1. Der Wasserpegel in den Wasserbädern muss im Bereich von 3,8 bis 5,0 cm (1,5 bis 2,0 Zoll), gemessen vom Metall-Auflagetray (unten am Wasserbad) bis zur Wasseroberfläche, gehalten werden. Damit wird eine ordnungsgemäße Wärmeübertragung sichergestellt.
2. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sollten die Wasserbäder jeweils ausschließlich für einen bestimmten Assayschritt reserviert werden.

H. Dekontamination

1. Oberflächen und Pipettierer

   Arbeitsflächen im Labor und Pipetten müssen regelmäßig mit einer 2,5-%igen bis 3,5-%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden. Lassen Sie die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf den Flächen einwirken. Spülen Sie sie anschließend mit Wasser ab. **Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen.** Chlorlösungen können Geräte und Metall angreifen. Spülen Sie die Geräte gründlich mit Wasser ab, um Lochfraß zu verhindern.

2. TCS-Absaugvorrichtung

   Nach jeder Verwendung:

   a. Schieben Sie die Dosiervorrichtung aus dem Weg.
   b. Setzen Sie eine neue TTC in den TTC-Ständer. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Bringen Sie die Absaugvorrichtung an den Spitzen im TTC an. Saugen Sie die gesamte Waschlösung ab, die sich noch in der Einspülwanne der Dispensierstation befindet.
   c. Gießen Sie mindestens 100 mL 0,5-%ige bis 0,7-%ige (0,07 M bis 0,1 M) oder, falls bevorzugt, 2,5-%ige bis 3,5-%ige (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung in die Einspülwanne. Aspirieren Sie die gesamte Lösung durch die Absaugvorrichtung.

d. Gießen Sie mindestens 100 mL deionisiertes Wasser in die Einspülwanne. Aspirieren Sie das gesamte Wasser durch die Absaugvorrichtung.
e. Werfen Sie die Spitzen in ihre Original-TTC aus.
f. Lassen Sie die Vakuumpumpe eingeschaltet, bis die Schläuche der Absaugvorrichtung trocken sind, um Rückfluss zu verhindern (ca. 3 Minuten).
g. Dekontaminieren Sie die Oberflächen der Absaugvorrichtung, wie in *TCS-Einheit* beschrieben.

3. TCS-Abfallbehälter

   Reinigen Sie die Abfallflasche mindestens einmal pro Woche oder wenn die Abfallflasche zu 25% voll ist, wobei das zuerst eintretende Ereignis ausschlaggebend ist.

   a. Schalten Sie die Vakuumpumpe aus und lassen Sie den Vakuumdruck angleichen.
   b. Geben Sie die Schnellverschlussvorrichtungen zwischen der Abfallflasche und der Überlaufflasche sowie der Abfallflasche und der Absaugvorrichtung frei.
   c. Entfernen Sie die Abfallflasche vom Gehäuse der Vakuumfalle.
   d. Entfernen Sie den Deckel und geben Sie vorsichtig 400 mL 5-%ige bis 7-%ige (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung in die 4-L-Abfallflasche.

      Hinweis: *Das kann unter einem Dunstabzug erfolgen, um die Freisetzung von Dämpfen in das Labor zu verhindern.*

   e. Verschließen Sie die Abfallflasche mit dem Deckel und vermischen Sie den Inhalt vollständig durch vorsichtiges Schwenken.
   f. Lassen Sie die Abfallflasche mindestens 15 Minuten stehen und entsorgen Sie dann den Inhalt (Abfall).
   g. Spülen Sie die Abfallflasche mit Wasser, um etwaigen Restabfall darin zu entfernen.
   h. Verschließen Sie die leere Abfallflasche und stellen Sie sie in das Gehäuse der Vakuumfalle. Bringen Sie die Schnellverschlussvorrichtungen an der TCS-Einheit an. Entsorgen Sie beide Handschuhe vorsichtig.

4. TCS-Einheit

   Wischen Sie die Oberflächen des TCS-Geräts, die Absaugvorrichtung und die Waschpuffer-Auswerferspitzen mit Papierhandtüchern ab, die mit 2,5-%iger bis 3,5-%iger (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung angefeuchtet wurden. Spülen Sie im Anschluss an den Schritt mit Natriumhypochloritlösung mit Wasser ab und trocknen Sie die Oberflächen anschließend vollständig mit Papierhandtüchern ab.

5. Ständer

   Tauchen Sie die Ständer in 2,5-%ige bis 3,5-%ige (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung. Stellen Sie dabei sicher, dass sie von der Lösung bedeckt sind. Lassen Sie die Ständer 10 Minuten lang eingetaucht. Eine längerer Kontakt hat Beschädigung der Ständer zur Folge. Spülen Sie die Ständer gründlich mit Wasser ab und trocknen Sie sie dann vollständig mit Papiertüchern ab.

I. Assaykontamination

1. Verunreinigungsmaterialien können eingeschleppt werden, wenn während des Assayverfahrens nicht mit genügend Vorsicht vorgegangen wird.

2. TTUs müssen mit Deaktivierungsflüssigkeit, wie unter *Testverfahren* beschrieben, dekontaminiert werden. Die TTUs dürfen nicht wiederverwendet werden.
3. Führen Sie eine regelmäßige Dekontamination der Geräte und Arbeitsflächen nach der oben in *Dekontamination* beschriebenen Anleitung durch.
4. Wie in jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhrchen verursachen. Es wird empfohlen, dass der Bediener ungepuderte Handschuhe trägt.

Qualitätskontrollverfahren

A. Validität des Laufs

1. Kalibratoren und Kontrollen müssen bei allen Tests und auf dem gleichen Ständer wie die Testproben mitgeführt werden. Damit ein Lauf als gültig angesehen werden kann, müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein:

   Durchschnittliche RLU des Kalibrators 2 > RLU-Grenzwert

   wobei RLU-Grenzwert = durchschnittliche RLU des Kalibrators 1
   + 1,645 Standardabweichungen der Kalibrator 1 RLU-Replikate
   + 1,645 Standardabweichungen der Kalibrator 2 RLU-Replikate.

   Durchschnittliche interpolierte Kalibrator-5-Wiederfindung = 100 ± 30%

   Durchschnittliche interpolierte Kontrolle-A-Wiederfindung = 100 ± 60%

   Durchschnittliche interpolierte Kontrolle-B-Wiederfindung = 100 ± 35%

2. Die PCA3-Software beurteilt die Ergebnisse automatisch entsprechend den vorstehenden Kriterien und berichtet den Laufstatus als PASS (ERFOLGREICH), wenn die Validitätskriterien erfüllt sind, und FAIL (FEHLGESCHLAGEN), wenn die Validitätskriterien nicht erfüllt sind.

3. Wenn der Laufstatus FAIL (FEHLGESCHLAGEN) ist, sind alle Testergebnisse im gleichen Lauf für diesen Analyt ungültig und dürfen nicht berichtet werden.

4. Wenn ein Lauf ungültig ist, muss der Lauf für diesen Analyten wiederholt werden (siehe *Interpretation der Ergebnisse*). Wenn der Lauf für den anderen Analyten gültig ist, können diese Ergebnisse in der Datenanalyse mit dem gültigen Wiederholungslauf des ersten Analyten verwendet werden.

B. Probenvalidität

   Innerhalb eines gültigen Laufs können einzelne Probenergebnisse als UNGÜLTIG angesehen werden und im Laufbericht mit Rohdaten angezeigt werden (siehe *Interpretation der Ergebnisse*). Obwohl einzelne Replikate einer Probe gültig sein können, wird eine Probe ungültig gemacht, wenn die interpolierte c/mL-Differenz zwischen den Replikaten über 600% liegt. Der Test der Probe für diesen Analyten muss wiederholt werden.

Interpretation der Ergebnisse

A. Berichttypen

1. Laufbericht mit Rohdaten

   Der Laufbericht mit Rohdaten stellt Informationen zur Laufvalidität (PASS (ERFOLGREICH) oder FAIL (FEHLGESCHLAGEN); siehe *Qualitätskontrollverfahren*) und zu den einzelnen Reaktionsröhrchen, die mit dem Progensa PCA3 Assay getestet werden, bereit. Wenn ein Lauf ungültig ist FAIL (FEHLGESCHLAGEN), werden alle Röhrchen in diesem Lauf als ungültig ausgewiesen. Einzelne Röhrchen können jedoch innerhalb eines gültigen Laufs (PASS (ERFOLGREICH)) als ungültig angesehen werden. Bei aufeinanderfolgenden Läufen (d.h. PCA3- und PSA-Analyte werden im gleichen Testlauf getestet) kann ein Analytlauf ungültig sein, während der andere Analytlauf gültig ist.

   Die Ausnahmen-Übersicht findet sich am Ende des Laufberichts mit Rohdaten. Bei aufeinanderfolgenden Läufen, wo beide Analytläufe gültig sind, kann es sein, dass die Proben, die in der Ausnahmen-Übersicht aufgeführt sind, einen Wiederholungstest eines Analyts erfordern. Obwohl ein PCA3 Score-Ergebnis in der Ausnahmen-Übersicht aufgeführt werden kann, gilt dieses Ergebnis nicht als berichtfähig, bis eine manuelle Anpassung durchgeführt wurde und das Ergebnis im Bericht mit Verhältnisdaten aufgeführt wird. Wenn nur ein Analyt getestet wurde oder wenn ein Analytlauf ungültig ist, werden alle getesten Proben in der Ausnahmen-Übersicht aufgeführt.

2. Bericht mit Verhältnisdaten

   Die Assay-Software erzeugt automatisch einen Bericht mit Verhältnisdaten für einen aufeinanderfolgenden Lauf, in dem beide Analytläufe gültig sind. Die Software berechnet und listet den PCA3 Score für die Proben im Bericht mit Verhältnisdaten auf. Die Proben, die im Bericht mit Verhältnisdaten aufgeführt werden, erfordern entweder keine weiteren Tests oder beide Analyte müssen erneut getestet werden. Die Proben, die nicht im Bericht mit Verhältnisdaten aufgeführt werden, werden im Abschnitt Ausnahmen-Übersicht des Laufberichts mit Rohdaten aufgelistet.

   Ein Bericht mit Verhältnisdaten kann auch nach der manuellen Anpassung generiert werden (weitere Informationen siehe *Manuelle Anpassung*).

3. QC (Qualitätskontrolle)-Bericht

   Der QC (Qualitätskontrolle)-Bericht listet die Laufvaliditätskriterien, zugewiesenen und interpolierten Konzentrationen und Wiederfindung von Kalibratoren und Kontrollen auf. Der Bericht listet auch die Parameter auf, die die logistische Dosisreaktions-Kalibrationskurve (3) mit vier Parametern definieren. Nähere Informationen finden Sie in der *Bedienungsanleitung der Progensa PCA3 Assay Software*.

B. Anpassung

1. Automatische Anpassung

   In aufeinanderfolgenden Läufen, wo beide Analytläufe gültig sind, passt die Software automatisch die einzelnen PCA3- und PSA-Analytergebnisse für die Proben an und ermittelt den PCA3 Score (falls berechenbar). Die Ergebnisse werden im Bericht mit Verhältnisdaten oder der Ausnahmen-Übersicht des Laufberichts mit Rohdaten aufgelistet.

2. Manuelle Anpassung

   Wenn die PCA3- und PSA-Analyte in verschiedenen Läufen getestet werden, kann die Software den PCA3 Score nicht automatisch ermitteln. Ein manueller Abgleich der Analytergebnisse ist erforderlich, um den PCA3 Score oder PCA3 Score-Bereich zu ermitteln (siehe die *Kurzanleitung* oder *Bedienungsanleitung für die Progensa PCA3 Assay Software*). Eine manuelle Anpassung kann auch für Ergebnisse erforderlich sein, die in der Ausnahmen-Übersicht des Laufberichts mit Rohdaten aufgelistet sind. Nach der manuellen Anpassung wird der PCA3 Score (bzw. die Scores) für die angepasste Probe (bzw. Proben) in einem neuen Bericht mit Verhältnisdaten aufgelistet.

C. Auswertung von Berichten

1. PCA3 Score (PCA3-Wert)

   Hinweis: Nur PCA3 Scores und PCA3 Score-Bereiche, die im Bericht mit Verhältnisdaten aufgelistet werden, können berichtet werden. *Ergebnisse, die in der Ausnahmen-Übersicht erscheinen, bedürfen möglicherweise weiterer Maßnahmen und sind nicht berichtfähig.*

   Der PCA3 Score wird als das Verhältnis von PCA3-RNA-Kopien zu PSA-RNA-Kopien, multipliziert mit 1000, berechnet. Die PCA3 Scores können nur mit Ergebnissen aus gültigen Läufen und Patientenproben berechnet werden. Ungültige Läufe und ungültige Proben müssen noch einmal für diesen Analyten getestet werden (nähere Einzelheiten siehe *Wiederholungstest*).

   Wenn der berichtete PCA3 Score unter dem Grenzwert liegt, ist das Ergebnis als NEGATIV auszulegen. Wenn der PCA3 Score dem Grenzwert entspricht oder darüber liegt, ist das Ergebnis als POSITIV auszulegen. Der Laborleiter legt den Grenzwert fest (nähere Einzelheiten siehe *Leistungsmerkmale*).

   Unter manchen Umständen wird ein PCA3 Score-Bereich (>[Berechneter PCA3 Score] oder <[Berechneter Score]) ausgegeben. Wenn <[Berechneter PCA3 Score] unter dem Grenzwert liegt, ist das Ergebnis als NEGATIV auszulegen. Wenn >[Berechneter PCA3 Score] über dem Grenzwert liegt, ist das Ergebnis als POSITIV auszulegen. Wenn ein numerischer Wert erforderlich ist, kann durch Probenverdünnung und Wiederholungstest ein PCA3 Score anstatt eines PCA3 Score-Bereichs generiert werden (siehe *Wiederholungstest* - *Verdünnung von Proben oberhalb des zulässigen Bereichs*).

2. Auswertung von Status- und Analysecodes

   Die Statusspalte im Laufbericht mit Rohdaten und dem Bericht mit Verhältnisdaten listet die Informationen im Format „s:a“ auf. Laufspezifische Statuscodes („s“) werden vor dem (links vom) Doppelpunkt und analytspezifische Analysecodes („a“) werden nach dem (rechts vom) Doppelpunkt aufgelistet. Analytspezifische Codes werden in Kleinbuchstaben für PCA3-Ergebnisse und in Großbuchstaben für PSA-Ergebnisse aufgeführt. Jeder Bericht enthält Beschreibungen der Status- und Analysecodes, die in diesem Bericht erscheinen. Zum Beispiel können die Codes angeben, ob ein Proben- oder Replikatergebnis gültig oder außerhalb des zulässigen Bereichs ist. Eine vollständige Auflistung der Status- und Analysecodes und nähere Einzelheiten finden Sie in der *Kurzanleitung* oder der *Bedienungsanleitung für die Progensa PCA3 Assay Software*.

Wenn ein PCA3 Score im Bericht mit Verhältnisdaten berichtet wird und keine Status- oder Analysecodes in den PCA3- oder PSA-Status-Spalten erscheinen, bedeutet das, dass die Testergebnisse der beiden Analyten gültig und „innerhalb des zulässigen Bereichs“ sind. Das Probenergebnis kann berichtet werden und keine weiteren Maßnahmen sind erforderlich.

Wenn ein Status- oder Analysecode in der Ausnahmen-Übersicht oder im Bericht mit Verhältnisdaten erscheint, kann ein Wiederholungstest erforderlich sein (siehe *Auswertung der Ergebnisse in der Ausnahmen-Übersicht* und *Auswertung der Ergebnisse im Bericht mit Verhältnisdaten*). Wenn Analytergebnisse aus verschiedenen Läufen bezogen werden und sie einen Analysecode (bzw. -codes) haben, suchen Sie die Kombination für beide Analyten in Tabelle 4 oder Tabelle 5 auf, um zu ermitteln, ob weitere Maßnahmen erforderlich sind.

Hinweis: *Das Vorliegen eines Status- oder Analysecodes bedeutet nicht automatisch, dass ein Wiederholungstest erforderlich ist.*

3. Auswertung der Ergebnisse in der Ausnahmen-Übersicht

   Die Ausnahmen-Übersicht listet möglicherweise keine Ausnahmen auf. In diesen Fällen sind keine weiteren Maßnahmen erforderlich.

   Wenn in der Ausnahmen-Übersicht eine Probe (bzw. Proben) für aufeinanderfolgende Läufe, in denen beide Analytläufe gültig sind, aufgelistet werden, schlagen Sie weitere Anweisungen in Tabelle 4 nach.

   Für einzelne Analytläufe schlagen Sie in *Auswertung von Status- und Analysecodes* nach. In aufeinanderfolgenden Läufen, bei denen ein Analytlauf ungültig ist, wiederholen Sie den Test des ungültigen Laufs (nähere Informationen siehe *Wiederholungstest*) und behandeln die Ergebnisse so, als ob einzelne Analytläufe durchgeführt worden wären. Eine manuelle Anpassung ist dann erforderlich.

   Eine Probe kann als ungültig ausgewiesen werden, obwohl die einzelnen Röhrchen (Replikate) als gültig ausgewiesen sein können. Die Probenvalidität wird durch das kombinierte Ergebnis der Replikate bestimmt, und eine große Differenz zwischen Replikaten macht eine Probe ungültig (weitere Informationen siehe *Qualitätskontrollverfahren*).

Tabelle 4: Bedingungen für Ausnahme-Übersicht für Progensa PCA3 Assay

PCA3-Ergebnis (Analysecode*)	PSA-Ergebnis (Analysecode*)	Aufgeführter PCA3 Score	Weitere Tests?	Maßnahme/Kommentar
Im Bereich (kein Code)	Ungültig** (A, B, E, H oder I)	--	Ja	PSA-Wiederholungstest durchführen (siehe *Wiederholungstest*) und die Ergebnisse manuell anpassen.
unter zulässigem Wertebereich (g)	Ungültig (A, B, E, H oder I)	--	Ja	PSA-Wiederholungstest durchführen (siehe *Wiederholungstest*) und die Ergebnisse manuell anpassen.
Ungültig (a, b, e, h oder i)	Im Bereich (kein Code)	--	Ja	PCA3-Wiederholungstest durchführen (siehe *Wiederholungstest*) und die Ergebnisse manuell anpassen.
Im Bereich (kein Code)	über zulässigem Wertebereich (F)	<[Berechneter PCA3 Score]***	Optional	1. Manuell anpassen, um den <[Berechneten PCA3 Score] zu erhalten, ODER 2. Probe in Probenverdünner verdünnen (siehe *Verdünnung von Proben oberhalb des zulässigen Bereichs*), PSA-Wiederholungstest durchführen und Ergebnisse manuell anpassen, wenn ein PCA3 Score erforderlich ist.
über zulässigem Wertebereich (f)	Im Bereich (kein Code)	>[Berechneter PCA3 Score]	Optional	1. Manuell anpassen, um den >[Berechneten PCA3 Score] zu erhalten, ODER 2. Probe in Probenverdünner verdünnen, PCA3-Wiederholungstest durchführen und Ergebnisse manuell anpassen, wenn ein PCA3 Score erforderlich ist.
unter zulässigem Wertebereich (g)	Im Bereich (kein Code)	<[Berechneter PCA3 Score]	Nein	Manuell anpassen, um den <[Berechneten PCA3 Score] zu erhalten.
unter zulässigem Wertebereich (g)	über zulässigem Wertebereich (F)	<[Berechneter PCA3 Score]	Nein	Manuell anpassen, um den <[Berechneten PCA3 Score] zu erhalten.

*Eine vollständige Liste der Analysecodes finden Sie in der *Bedienungsanleitung der Progensa PCA3 Assay Software*.

**Gilt nur für ungültige Proben innerhalb eines gültigen Laufs.

***Für Werte außerhalb des zulässigen Bereichs wird der berechnete PCA3 Score unter Verwendung des Kopien-Niveaus für den nächstgelegenen Positivkalibrator berechnet.

4. Auswertung der Ergebnisse im Bericht mit Verhältnisdaten

   Wenn eine Probe im Bericht mit Verhältnisdaten mit einem PCA3 Score aufgelistet wird, ist das Ergebnis ein berichtfähiger PCA3 Score und keine weiteren Maßnahmen sind erforderlich. Wenn kein PCA3 Score aufgelistet wird, was als „--“ in der PCA3 Score-Spalte ausgedrückt wird, schlagen Sie weitere Anweisungen in Tabelle 5 nach.

Tabelle 5: Bedingungen für Bericht mit Verhältnisdaten für Progensa PCA3 Assay

PCA3-Ergebnis (Analysecode*)	PSA-Ergebnis (Analysecode*)	Aufgeführter PCA3 Score	Weitere Tests?	Maßnahme/Kommentar
Im Bereich (kein Code)	Im Bereich (kein Code)	PCA3 Score	Nein	Keine weiteren Maßnahmen; das Ergebnis ist berichtfähig.
Ungültig** (a, b, e, h oder i)	Ungültig (A, B, E, H oder I)	--	Ja	Wiederholungstest für beide Analyten durchführen (siehe *Wiederholungstest*).
Ungültig (a, b, e, h oder i)	über zulässigem Wertebereich (F)	--	Ja	Probe in Probenverdünner verdünnen (siehe *Verdünnung von Proben oberhalb des zulässigen Bereichs*), Wiederholungstest beider Analyten durchführen.
über zulässigem Wertebereich (f)	Ungültig (A, B, E, H oder I)	--	Ja	Probe in Probenverdünner verdünnen, Wiederholungstest beider Analyte durchführen.
über zulässigem Wertebereich (f)	über zulässigem Wertebereich (F)	--	Ja	Probe in Probenverdünner verdünnen, Wiederholungstest beider Analyte durchführen.
Ungültig (a, b, e, h oder i)	unter zulässigem Wertebereich (G)	--	Nein	Probe weist ungenügend RNA für eine korrekte Analyse auf. Eine neue Probe muss vom Patienten entnommen werden.
Im Bereich (kein Code)	unter zulässigem Wertebereich (G)	--	Nein	Probe weist ungenügend RNA für eine korrekte Analyse auf. Eine neue Probe muss vom Patienten entnommen werden.
über zulässigem Wertebereich (f)	unter zulässigem Wertebereich (G)	--	Nein	Probe weist ungenügend RNA für eine korrekte Analyse auf. Eine neue Probe muss vom Patienten entnommen werden.
unter zulässigem Wertebereich (g)	unter zulässigem Wertebereich (G)	--	Nein	Probe weist ungenügend RNA für eine korrekte Analyse auf. Eine neue Probe muss vom Patienten entnommen werden.

*Eine vollständige Liste der Analysecodes finden Sie in der *Bedienungsanleitung der Progensa PCA3 Assay Software*.

**Gilt nur für ungültige Proben innerhalb eines gültigen Laufs. Wenn Proben aufgrund eines ungültigen Laufs ungültig waren, werden die Ergebnisse in der Ausnahmen-Übersicht aufgelistet (weitere Informationen siehe *Auswertung der Ergebnisse in der Ausnahmen-Übersicht*).

D. Wiederholungstest

1. Richtlinien für Wiederholungstests

   a. Obwohl es nicht unbedingt erforderlich ist, dass beide Analyte im gleichen Lauf getestet werden, **müssen die Ergebnisse von beiden Analyten aus dem gleichen Probenfläschchen kommen, damit der PCA3 Score berichtet werden kann**.

   b. Alle ungültigen Läufe müssen wiederholt werden und alle ungültigen Proben aus gültigen Läufen müssen erneut getestet werden.

   c. Führen Sie die Wiederholungstests der Proben mit einem neuen Satz Kalibratoren und Kontrollen durch.

   d. Die richtige Lagerung von Probenresten vor dem Wiederholungstest ist sehr wichtig (weitere Informationen siehe *Probenentnahme, -transport und -lagerung*).

   e. Eine manuelle Anpassung von PCA3- und PSA-Analyten kann erforderlich sein, um den PCA3 Score zu ermitteln (nähere Informationen siehe *Manuelle Anpassung*).

2. Verdünnung von Proben oberhalb des zulässigen Bereichs

   a. Wenn eine Probenkonzentration innerhalb eines gültigen Laufs über dem Kalibrator 5 extrapoliert wird, ist das Ergebnis „oberhalb des zulässigen Bereichs“, und das Ergebnis wird mit dem Analysecode „f“ oder „F“ in den Laufberichten ausgewiesen. Die Konzentration wird als >[Kalibrator-5-Konzentration] ausgedrückt.

   b. Drehen Sie die behandelte Urinprobe um, um sie vor der Probenverdünnung zu vermischen. Eine empfohlene, jedoch nicht erforderliche Verdünnung ist 1:10 mit dem Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Geben Sie in ein entsprechendes Fläschchen 1800 µL Probenverdünner und 200 µL Probe. Verschließen Sie das Röhrchen und drehen Sie es 5-mal um, um es vollständig zu vermischen. Der Verdünnungsfaktor ist „10“ in der Arbeitsliste des Laufs. Wenn ein Wiederholungstest beider Analyte erfolgen soll, verdoppeln Sie die Volumen (3600 µL Probenverdünner und 400 µL Probe). Nähere Anweisungen finden Sie in der Packungsbeilage des Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Testen Sie die verdünnte Probe mit dem Assay.

   c. Wenn nach dem Wiederholungstest das Probenergebnis wieder oberhalb des zulässigen Bereichs liegt, ist eine weitere Verdünnung erforderlich, bis das Probenergebnis innerhalb des Kalibratorbereichs fällt. Eine weitere Verdünnung der anfänglichen 1:10-Verdünnung ist zulässig, vorausgesetzt die anfängliche 1:10-Verdünnung wurde vorschriftsmäßig gelagert (nähere Informationen siehe *Probenentnahme, -transport und -lagerung*).

Einschränkungen

A. Der Progensa PCA3 Assay sollte nicht für Patienten verwendet werden, die Medikamente mit bekannter Auswirkung auf die Serum-PSA-Konzentrationen einnehmen, z.B. Finasterid (Proscar, Propecia), Dutasterid (Avodart) und Antiandrogentherapie (Lupron). Die Wirkung dieser Medikamente auf die PCA3-Genexpression wurde noch nicht beurteilt.

B. Bestimmte therapeutische und diagnostische Verfahren, wie z.B. Prostatektomie, Bestrahlung, Prostatabiopsie und andere, können die Lebensfähigkeit von Prostatagewebe beeinträchtigen und sich anschließend auf den PCA3 Score auswirken. Die Wirkung dieser Verfahren auf die Assayleistung wurde noch nicht beurteilt. Proben für PCA3 Assays sollten gesammelt werden, wenn der Kliniker der Ansicht ist, dass das Prostatagewebe wiederhergestellt ist.

C. Der Progensa PCA3 Assay darf nur von Mitarbeitern durchgeführt werden, die im Verfahren unterwiesen wurden. Eine Nichtbefolgung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben.

D. Jedes Labor muss ein LIS-Transferverfahren unabhängig validieren.

E. Zuverlässige Ergebnisse hängen von einer angemessenen Urinprobenentnahme ab. Weil das für den Progensa PCA3 Assay verwendete Transportsystem keine mikroskopische Beurteilung der Eignung der Urinprobe zulässt, ist eine Schulung des klinischen Personals in den ordnungsgemäßen Urinprobenentnahmetechniken erforderlich. Siehe *Probenentnahme, -transport und -lagerung*. Detaillierte Informationen finden Sie in der Packungsbeilage des Progensa PCA3 Transportkits für Urinproben.

F. Die Ergebnisse des Progensa PCA3 Assays müssen in Verbindung mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden Labordaten und klinischen Befunden interpretiert werden. (Die Testergebnisse können durch unsachgemäße Probenahme, technische Fehler oder Probenverwechselung beeinträchtigt sein.)

Leistungsmerkmale

A. Klinische Ergebnisse

1. Diagnostische Sensitivität und Spezifität

   Die Leistungscharakteristika für den Progensa PCA3 Assay wurden mit Proben von Probanden, die an vier geographisch verschiedenen Prüfzentren in Nordamerika aufgenommen wurden, bestimmt. Die Probandenpopulation bestand aus 529 Männern, für die eine Prostatabiopsie angesetzt wurde. Die demographischen Angaben für die Probanden sind wie folgt:

   a. Durchschnittsalter ± SA = 64 ± 8 Jahre (Median 63, Spannweite 32 bis 89)
   b. Durchschnittliche Serum-PSA-Konzentration = 7,9 ± 21,9 µg/L (5,6, 0,3 bis 484)
   c. Durchschnittliches Prostatavolumen (mit transrektalem Ultraschall ermittelt) = 44 ± 25 cc (39, 5 bis 225)
   d. 34% (180/529) positive Biopsie für Prostatakrebs

Abbildung 3 zeigt die Korrelation des PCA3 Scores mit der Wahrscheinlichkeit einer positiven Biopsie auf. Mit steigendem PCA3 Score stieg das Auftreten einer karzinompositiven Biopsie bei den Probanden an.

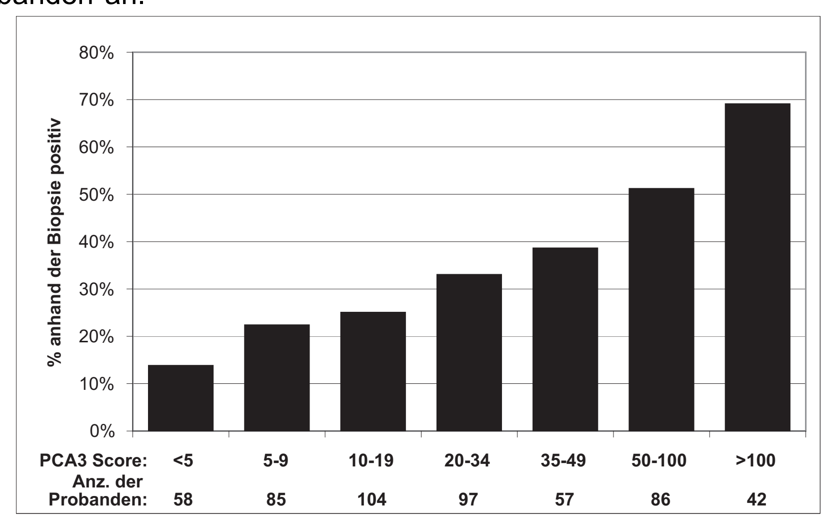


Abbildung 3. Korrelation von PCA3 Score mit Wahrscheinlichkeit einer positiven Biopsie

Eine ROC (Receiver Operating Characteristic)-Analyse wurde unter Einsatz der Prostatabiopsie als Referenzmethode gemäß CLSI GP10-A (1995) durchgeführt (4). Für den Progensa PCA3 Assay betrug der Bereich unter der Kurve (AUC) 0,685 (95% Vertrauensintervall = 0,637 bis 0,733). Tabelle 6 zeigt die diagnostische Sensitivität und Spezifität bei verschiedenen PCA3 Score-Grenzwerten. Jedes Labor sollte den Grenzwert für die diagnostische Sensitivität oder Spezifität festlegen (siehe *Interpretation der Ergebnisse*).

Tabelle 6: Diagnostische Sensitivität und Spezifität des Progensa PCA3 Assays bei verschiedenen PCA3 Score-Grenzwerten

PCA3 Score-Grenzwert	5	10	15	25	35	50	95
Sensitivität	96%	85%	77%	63%	53%	41%	17%
Spezifität	14%	33%	47%	61%	74%	84%	95%

2. Probenstabilitätsstudien
   a. Stabilität in Vollurin: Von 10 Probanden wurde Erststrahlurin gesammelt und vor der Behandlung durch Zugabe von Urintransportmedium (UTM) bei 2 °C bis 8 °C oder bei 30 °C gelagert. Bei 2 °C bis 8 °C wurde nach 4 Stunden in manchen Proben eine signifikante PCA3- und PSA-RNA-Degradation beobachtet. Daher muss Vollurin innerhalb von 4 Stunden behandelt werden. Bei 30 °C wurde in weniger als 1 Stunde eine signifikante Degradation beobachtet. Daher muss Vollurin vor der Behandlung stets gekühlt oder auf Eis gelagert werden.
   b. Stabilität in behandeltem Urin: Zwölf Proben wurden bei 4 °C oder 30 °C bis zu 38 Tage inkubiert. Bei 4 °C waren PCA3- und PSA-RNA 21 Tage lang stabil; bei 30 °C 5 Tage lang. Die bei -20 °C und -70 °C gelagerten Proben zeigten bis zu 90 Tage PCA3- und PSA-RNA-Stabilität.
   c. Einfrier-Auftau-Stabilität: Die Proben wurden 6-mal einem Zyklus zwischen 37 °C und -70 °C unterworfen. Es wurden keine verringerten Spiegel von PCA3- oder PSA-RNA-Kopien beobachtet.

B. Analytische Ergebnisse

1. Analytische Sensitivität

   Ein analytisches Sensitivitätspanel, das aus verdünntem *in vitro* RNA-Transkript bestand, wurde zur Beurteilung der Assaysensitivität verwendet. Ein Bediener testete das Panel in 12 Läufen mit fünf Replikaten unter Einsatz einer einzigen Reagenzcharge. Die Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze wurden gemäß CLSI EP17-A (2004) berechnet (5). Die Nachweisgrenze des PCA3-Analyten betrug 80 c/mL und für den PSA-Analyten 1438 c/mL. Die Quantifizierungsgrenze beider Analyten war Kalibrator 2.

2. Analytische Spezifität
   a. Ungespleißtes Transkript: Der Progensa PCA3 Assay wurde zum ausschließlichen Nachweis der prostatakrebsspezifischen Exon 3-Exon 4-gespleißten PCA3-RNA entwickelt (2). Der Assay erzielte keine Detektion von 1 Million c/mL ungespleißter PCA3-RNA signifikant über dem Hintergrund.
   b. Prostataspezifität von PCA3-RNA im Urin: Proben von Probanden (n = 97), die eine radikale Prostatektomie hinter sich hatten, wurden mit dem Progensa PCA3 Assay getestet und die PCA3-RNA-Spiegel wurden mit denen von Probanden (n = 464) vor der Biopsie verglichen. Der mediane PCA3-RNA c/mL-Wert lag unter der Nachweisgrenze des Assays für Proben von Probanden nach der Prostatektomie, während der mediane PCA3-RNA c/mL-Wert für Probanden vor der Biopsie 7243 c/mL betrug. Diese Daten bestätigen, dass PCA3-RNA in Urin aus der Prostata stammt.
   c. Gewebespezifität: Gesamt-RNA wurde aus Gewebe von zwei spezifischen männlichen Spendern pro Gewebetyp extrahiert, zum Probenverdünner hinzugegeben (10 ng pro Reaktion) und mit dem Progensa PCA3 Assay getestet. Das Prostatagewebe war unter den in Tabelle 7 aufgeführten Gewebetypen der einzige, der über der PCA3-RNA-Nachweisgrenze nachgewiesen wurde.

Tabelle 7: Männliche Gewebetypen, die auf PCA3-RNA getestet wurden

Gewebetyp	
Blase (normal)	Niere
Blase (Tumor)	Penis
Knochenmark	Prostata
Ductus deferens	Vesikulardrüse
Epididymus	Testis

d. Interferierende Substanzen: Die in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen wurden zu Aliquots von gepooltem behandeltem männlichen Urin hinzugefügt. Die Proben wurden mit dem Progensa PCA3 Assay gemäß CLSI EP7-A2 (2005) getestet (6). Bei den aufgeführten Konzentrationen wurde keine Assay-Interferenz beobachtet.

Tabelle 8: Für Progensa PCA3 Assay-Interferenz getestete Substanzen

Therapeutische Wirkstoffe	
Substanz	**Testkonzentration**
Acetaminophen/Codein	5,34 µmol/L
Atorvastatin	25 mg/L
Lisinopril	0,74 µmol/L
Amlodipin	245 µmol/L
Atenolol	37,6 µmol/L
Sulfasalazin	754 µmol/L
Esomeprazol	120 mg/L
Allopurinol	294 µmol/L
Diphenhydramin	19,6 µmol/L
Acetaminophen	1324 µmol/L
Acetylsalicylsäure	3,62 mmol/L
Ibuprofen	2425 µmol/L
Furosemid	181 µmol/L
Ciprofloxacin	30,2 µmol/L
Levaquin	48,6 µmol/L
Doxycyclin	67,5 µmol/L
Fluoxetinhydrochlorid	11,2 µmol/L
Flutamid	1500 mg/L
Dutasterid	1,5 mg/L

Therapeutische Wirkstoffe (Fortsetzung)	
Substanz	**Testkonzentration**
Uroxatral	30 mg/L
Doxazosin	1,33 µmol/L
Terazosin	7,8 µmol/L
Finasterid	15 mg/L
Tamsulosin	1,2 µg/L
Metformin	310 µmol/L
Sildenafil	12,9 pmol/L
Saw Palmetto (Sägepalme)	1600 mg/L
Selen	0,275 mg/L

Urinbestandteile	
Substanz	**Testkonzentration**
Harnsäure	1,4 mmol/L
Hämoglobin	2 g/L
Weiße Blutkörperchen	4,56 x 10^7 Zellen/L
Erythrozyten	3,06 x 10^7 Zellen/L
Albumin	50 g/L
Bilirubin (unkonjugiert)	342 g/L
IgG	60 g/L

3. Genauigkeit

Die Genauigkeit des Progensa PCA3 Assays wurde gemäß CLSI EP15-A2 (2005) (7) beurteilt. PCA3- und PSA-RNA-Transkripte wurden mit UV-vis-Spektrophotometrie quantifiziert, zu behandeltem normalem weiblichem Urin (keine nachweisbare PCA3- oder PSA-RNA) hinzugefügt und die Konzentrationen wurden im Progensa PCA3 Assay gemessen. Die prozentuale (%) Wiederfindung wurde als Verhältnis von gemessenen c/mL zu hinzugefügten c/mL, multipliziert mit 100, berechnet.

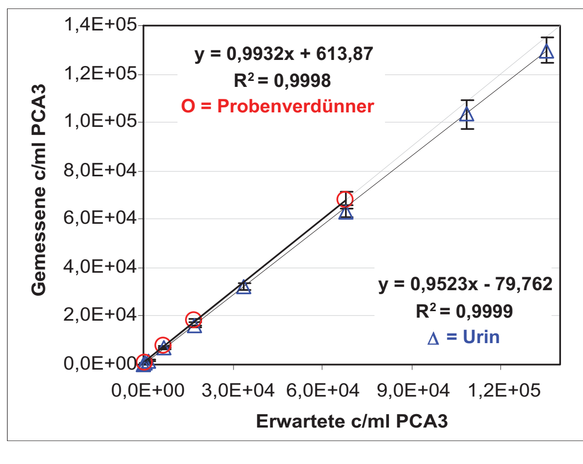
Tabelle 9: Kopie-Wiederfindung des Progensa PCA3 Assay

Analyt	Bekannte Konzentration, c/mL	Gemessene Konzentration, c/mL	% Wiederfindung
PCA3-	750	808	108%
	7500	7618	102%
	18.750	18.722	100%
	75.000	70.287	94%
PSA-	20.000	23.684	118%
	250.000	278.373	111%
	500.000	599.941	120%
	1.750.000	1.960.775	112%

4. Linearität und linearer Bereich

Der lineare Bereich des Progensa PCA3 Assays wurde gemäß CLSI EP6-A (2003) (8) auf der Grundlage der linearen Regressionsanalyse (kleinste Quadrate) bestimmt. Zwei Sätze Verdünnungsreihen wurden von Proben, die hohe PCA3- und PSA-RNA-Konzentrationen aufwiesen, hergestellt. Ein Satz wurde in behandeltem weiblichen Urin verdünnt und ein Satz wurde in Probenverdünner verdünnt. Die Verdünnungen erstreckten sich über den gesamten Assay-Gültigkeitsbereich zwischen dem niedrigsten und dem höchsten positiven Kalibrator für jeden Analyten. Mit dem Assay gemessene Ergebnisse für den PCA3-Analyten und den PSA-Analyten zeigten eine direkte proportionale Beziehung zwischen den getesteten Verdünnungen und den berichteten Analyt-c/mL. Es trat kein signifikanter Verdünnungsmatrixeffekt auf. Siehe Abbildung 4.

PCA3-Analyt



PSA-Analyt

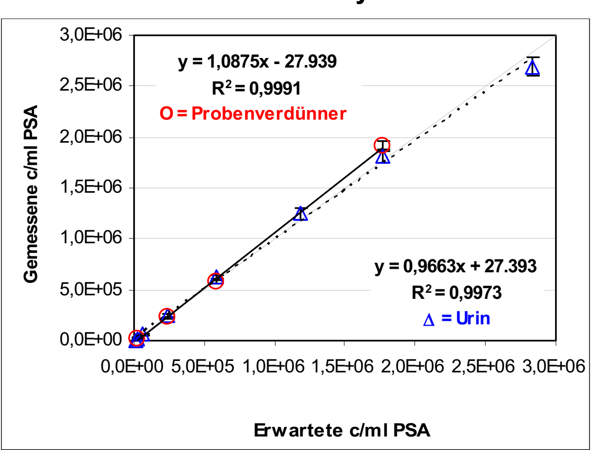


Abbildung 4. Linearität des Progensa PCA3 Assays für PCA3- und PSA-Analyte

5. Präzision

Die Präzision des Progensa PCA3 Assays wurde gemäß CLSI EP5-A2 (2004) beurteilt (9). Wiederholbarkeit ist Präzision unter Bedingungen minimaler Variabilität, und Reproduzierbarkeit ist Präzision unter Bedingungen maximaler Variabilität.

Für die Wiederholbarkeit wurde ein Testpanel mit 3 Proben, das aus verdünntem *in vitro* RNA-Transkript bestand, hergestellt. Ein Bediener an einem Prüfzentrum testete das Panel in 20 Läufen von 5 Replikaten über 20 Tage unter Verwendung einer/eines einzigen Kalibrator- und Kontrollencharge, Reagenzcharge und Gerätesatzes. Tabelle 10 zeigt die Wiederholbarkeitspräzision des Progensa PCA3 Assays bei verschiedenen Testkonzentrationsniveaus.

Tabelle 10: Wiederholbarkeit des Progensa PCA3 Assays

Analyt	Panel-probe	Durchschnitt c/mL	Wiederholbarkeit SD	Wiederholbarkeit VK
PCA3-	1	1228	145	12%
	2	12.020	809	7%
	3	61.108	2489	4%
PSA-	1	48.091	3715	8%
	2	484.457	41.026	8%
	3	2.001.430	131.554	7%

Für die Reproduzierbarkeit wurde ein Testpanel mit 8 Elementen, die gepoolte Proben (1 bis 3) und verdünntes *in vitro* RNA-Transkript (4 bis 8) umfassten, hergestellt. Drei Bediener testeten das Panel in 18 Läufen über 3 Tage unter Einsatz einer einzigen Kalibrator- und Kontrollencharge, 3 Reagenzchargen und 3 Gerätesätzen. In Tabellen 11 und 12 werden die Gesamtpräzision, Präzision innerhalb eines Laufs und zwischen Läufen, Bediener-, Geräte- und Chargenpräzision des Progensa PCA3 Assays für Analyt-c/mL und für den PCA3 Score zusammengefasst.

Die Variabilität innerhalb eines Laufs, zwischen Bedienern und zwischen Läufen waren in absteigender Reihenfolge die größten beitragenden Faktoren zur Assay-Gesamtvarianz. Die Reagenzcharge und die Geräte trugen wenig zur Assay-Gesamtvarianz bei. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Progensa PCA3 Assay eine reproduzierbare Leistung hat und dass die primäre Variationsquelle Zufallsfehler ist (innerhalb eines Laufs).

Tabelle 11: Reproduzierbarkeit des Progensa PCA3 Assays: Kopie/mL-Analyse

Analyt	Panel-probe	n	Gemessene c/mL	Gesamt-VK	VK inner-halb eines Laufs	VK zwischen Läufen	VK zwischen Bedienern	VK zwischen Geräten	VK zwischen Chargen
PCA3-	1	36	248	27%	24%	7%	15%	11%	0%
	2	36	7021	11%	6%	9%	9%	0%	0%
	3	36	31.469	8%	6%	5%	9%	0%	4%
	4	36	1469	15%	13%	7%	6%	0%	1%
	5	36	14.844	7%	5%	2%	6%	0%	4%
	6	36	72.372	7%	4%	6%	0%	1%	0%
	7	36	430	26%	26%	0%	11%	0%	1%
	8	36	62.274	13%	8%	8%	3%	0%	5%
PSA-	1	34	52.739	9%	6%	6%	7%	4%	2%
	2	34	218.789	10%	6%	7%	7%	4%	0%
	3	32	1.073.920	11%	4%	6%	9%	8%	0%
	4	34	37.185	9%	5%	7%	3%	0%	1%
	5	32	386.504	10%	4%	8%	6%	3%	4%
	6	34	1.518.748	12%	5%	8%	4%	3%	7%
	7	32	11.007	14%	8%	9%	0%	6%	0%
	8	34	1.694.404	11%	7%	7%	0%	1%	6%

Tabelle 12: Reproduzierbarkeit des Progensa PCA3 Assays: PCA3 Score-Analyse

Panel-Probe*	n	Mittlerer Score	Gesamt-VK	VK inner-halb eines Laufs	VK zwischen Läufen	VK zwischen Bedienern	VK zwischen Geräten	VK zwischen Chargen
1	34	5	27%	26%	5%	23%	8%	0%
2	34	32	14%	9%	10%	12%	0%	2%
3	32	30	12%	7%	5%	17%	7%	6%
7	32	39	28%	24%	2%	8%	11%	7%
8	34	37	21%	14%	12%	0%	0%	9%

*Die Panelproben 4 bis 6 enthielten nur PCA3- oder PSA-RNA-Transkript und wurden daher in dieser Analyse nicht berücksichtigt.

Bibliographie

1. **Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. Cancer Res. **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeney, J.A. Witjes, and J.A. Schalken**. 2003. $DD3^{PCA3}$-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. European Urology. **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. Aptima PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. Clin Chem. **52**:1089-95.
4. **CLSI**. 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI**. 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI**. 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI**. 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI**. 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.

:

Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Kundensupport: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Technischer Kundendienst: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, Den Haag
Niederlande

501377DE Rev. 001

2014-11